

UNIVERSITE DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1934-1935

N° 28

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE TOXICOLOGIQUE DU FLUOR

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

présentée et soutenue le 13 juillet 1935

par

Suzanne BAZILLE

Pharmacien

Lauréat de la Faculté de Pharmacie de Paris

JURY { MM. TASSILLY, *Président.*
FABRE, *Professeur.*
BEDEL, *Agrégé.*

PARIS

IMPRIMERIE HENRY

30, Rue Pascal (5°)

1935

UNIVERSITE DE PARIS

FACULTE DE PHARMACIE

Année 1934-1935

N° 28

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE TOXICOLOGIQUE DU FLUOR

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

présentée et soutenue le 13 juillet 1935

par

Suzanne BAZILLE

Pharmacien

Lauréat de la Faculté de Pharmacie de Paris

JURY	{	MM. TASSILLY, <i>Président.</i>
		FABRE, <i>Professeur.</i>
		BEDEL, <i>Agrégé.</i>

PARIS

IMPRIMERIE HENRY

30, Rue Pascal (5°)

1935

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. GUERIN, Doyen, O. *, I.
P. LEBEAU, Assesseur, O. *, I.
P. DESPORT, Secrétaire, *, I.

PROFESSEURS

MM. GUERIN, O. *, I.	Botanique générale.
PERROT, O. *, I.	Histoire naturelle des médicaments.
COUTIERE, O. *, I.	Zoologie.
LEBEAU, O. *, I.	Pharmacie chimique.
BOUGAULT, O. *, I.	Chimie analytique.
GORIS, O. *, I.	Pharmacie galénique.
TASSILLY, O. *, I.	Physique.
DAMIENS, *, I.	Chimie minérale.
HERISSEY, O. *, I.	Chimie biologique.
SOMMELET, *, I.	Chimie organique.
LUTZ, *, I.	Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, *, I.	Toxicologie.
LAUNOY, O. *, I.	Professeur sans chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. *, I.

Professeurs honoraires : MM. BEHAL, G. O. *, I.,
DELEPINE, O. *, I.,
Membres de l'Institut;
M. GUERBET, *, I.

CHARGES DE COURS

MM. Marc HONNORAT, *, I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LAUNOY, O. *, I.	Pharmacodynamie.
DELABY, *, A.	Hydrologie et Hygiène.
PICON, *, I.	Chimie minérale et Minéralogie.
BACH, *, I.	Microbiologie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. DELABY, *, I.	MM. MASCRE, *, I.	MM. BEDEL, *, I.
PICON, *, I.	FLEURY, *, I.	REGNIER, *, I.
	BACH, *, I.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, *, I., agrégé, chargé des T.P. de
1^{re} année ... Chimie générale.
FLEURY, *, I., et REGNIER, *, I., agrégés,
chargés des travaux de ... Chimie analytique.
SOUEGES, *, I. ... Micrographie.
LEROUX, *, I. ... Physique.
DEVAL, *, I. ... Microbiologie.
DELABY, *, I., PICON, *, I., et MASCRE, *, I. :
agrégés, chargés des travaux généraux de 4^e année.

Bibliothécaire en Chef : M. BERNARD, *, I.



A MES PARENTS

*J'offre ce travail, gage de mon
affection et de ma reconnaissance.*

A Monsieur le PROFESSEUR RENÉ FABRE,
Professeur de Toxicologie à la Faculté de Pharmacie de Paris.
Professeur de Toxicologie à l'Institut d'Hygiène Industrielle
et de Médecine du Travail de la Faculté de
Médecine de Paris.
Pharmacien en Chef du Groupe Hospitalier
Necker-Enfants-Malades.
Conseiller sanitaire technique, chargé de la Direction des
Laboratoires de l'Académie de Médecine et du
Ministère de la Santé Publique.
Chevalier de la Légion d'Honneur.

*En témoignage de profonde reconnaissance
et de respectueux attachement.*

MEIS ET AMICIS

INTRODUCTION

M. le Professeur René FABRE en nous proposant d'apporter une contribution à l'étude du fluor au point de vue toxicologique, savait nous intéresser à un sujet d'actualité.

En effet, si les accidents dus à l'absorption massive de dérivés fluorés constituent des exceptions dans l'histoire de la toxicologie, l'action nocive de ces composés — et en particulier de l'acide fluorhydrique — absorbés à faibles doses, a été reconnue, depuis ces dernières années, être la cause d'empoisonnements chroniques, qui relèvent de la toxicologie industrielle.

Nous avons mis au point une méthode de micro-dosage du fluor par spectrophotométrie. Malheureusement, cette méthode s'est révélée inapplicable à la toxicologie, et nous avons dû réaliser un autre procédé de dosage combinant l'entraînement du fluor à l'état d'acide hydrofluosilicique, selon la technique de H.-H. WILLARD et O.-B. WINTER [107], avec un titrage basé sur une réaction colorée du fluor avec le mélange de nitrate de zirconium et d'alizarine-sulfonate de sodium.

Le fluor est un élément volatil et les difficultés rencontrées par les auteurs qui ont voulu l'isoler des milieux complexes sont surtout imputables à cette propriété.

Le toxicologue, appelé à rechercher et à doser les éléments dans les viscères, les isole auparavant du milieu organique. Dans le cas du fluor, nous avons pensé pouvoir utiliser l'ultrafiltration pour réaliser la séparation de la matière organique sans la détruire. La technique que nous avons pratiquée ne nous ayant pas donné satisfaction, nous avons essayé — avec succès cette fois — l'électrodialyse.

La technique que nous proposons nécessite un matériel de laboratoire qu'il est facile de se procurer. Les appareils en sont assez simples, et le *modus operandi* ne demande pas une longue pratique.

En possession d'un procédé de dosage mis au point, nous avons fait quelques recherches de toxicologie expérimentale sur l'animal.

Si les essais que nous avons faits sont trop peu nombreux pour qu'on en puisse tirer des conclusions définitives, ils nous ont permis néanmoins, non seulement de vérifier que notre technique répondait aux conditions exigées pour les recherches toxicologiques, mais encore d'apporter une contribution à la connaissance des localisations du fluor dans l'organisme et de préciser son action et sa répartition.

Le plan que nous avons adopté est le suivant :

INTRODUCTION.

I. — LE FLUOR NORMAL DANS LES TISSUS ANIMAUX.

II. — ACTION TOXIQUE DU FLUOR ET DE SES DÉRIVÉS.

IMPORTANCE DE LA TOXICOLOGIE DU FLUOR.

III. — MÉTHODES DE DOSAGE DU FLUOR.

1. Etude de quelques micro-méthodes.
2. Recherche d'une méthode applicable à la toxicologie :
 - A. Méthode spectrophotométrique ;
 - B. Méthodes colorimétriques.

IV. — MODES D'ÉLIMINATION DE LA MATIÈRE ORGANIQUE.

1. Destruction.
2. Ultrafiltration.
3. Electrodialyse.

V. — MÉTHODE UTILISÉE.

1. Electrodialyse des bouillies d'organes.
2. Distillation par le procédé de H.-H. WILLARD et O.-B. WINTER.
3. Élimination du chlore.
4. Dosage colorimétrique selon la réaction de J.-H. DE BOËR.

VI. — TOXICOLOGIE EXPÉRIMENTALE.

1. Intoxications aiguës.
2. Intoxications chroniques.

CONCLUSIONS.

Toutes nos recherches ont été effectuées, en son laboratoire, sous la haute direction du Professeur René FABRE Professeur de Toxicologie à la Faculté de Pharmacie de Paris et à l'Institut d'Hygiène Industrielle et de Médecine du Travail de la Faculté de Médecine de Paris, qui a été pour nous, au cours de ces dernières années, le guide le plus sûr et le plus informé. Grâce aux conseils qu'il nous a prodigués et à la bienveillante sollicitude qu'il nous a toujours manifestée, ce travail a pu être mené à bien, et nous garderons de notre séjour à ses côtés la plus profitable des leçons, en même temps que le plus agréable des souvenirs.

Nous le prions d'agréer ici, avec notre très vive gratitude, l'expression de notre entier et respectueux dévouement.

Nous adressons à M. le Professeur E. TASSILLY, Professeur de Physique à la Faculté de Pharmacie de Paris, nos sentiments de respectueuse reconnaissance pour nous avoir fait le grand honneur d'accepter la Présidence de cette thèse.

A M. Ch. BEDEL, Professeur agrégé à la Faculté de Pharmacie de Paris, qui a bien voulu faire partie de notre jury, nous exprimons nos respects et notre reconnaissance.

A nos Maîtres de la Faculté de Pharmacie de Paris, dont l'enseignement si divers fut pour nous une source de satisfactions, nous voulons adresser nos sentiments de gratitude.

Et nous tenons particulièrement à remercier M. Henri LEROUX, Chef de Travaux Pratiques de Physique à la Faculté de Pharmacie de Paris, Pharmacien en Chef de l'Hôpital St-Louis, qui — après nous avoir orientée vers les études pharmaceutiques — nous a toujours prodigué, avec une affectueuse sympathie, des conseils que nous n'oublions pas. Il a certainement contribué, par son ensei-

gnement, à nous donner le goût de la recherche, et nous l'assurons de notre respectueuse affection.

Au laboratoire, nous avons été guidée et conseillée, à maintes reprises, par Mlle M.-T. REGNIER. Sa compétence en physiologie nous aura été très précieuse au cours de nos essais sur l'animal, qu'elle a suivis avec intérêt. Pour l'aide constante qu'elle nous a apportée, nous lui exprimons notre vive gratitude.

A ce souvenir, nous voulons associer celui de Mlle J. LEMÉNAGER, qui a été pour nous la plus serviable des aides. Nous l'assurons de notre reconnaissance et, ainsi que Mlle REGNIER, de notre affectueuse sympathie.

Enfin, nous voulons adresser un souvenir cordial à nos camarades de laboratoire, avec qui nous avons entretenu des relations amicales au cours de ces dernières années.

CHAPITRE PREMIER

**LE FLUOR NORMAL
DANS LES TISSUS ANIMAUX**

Le premier, semble-t-il, MORICHINI, en 1802, signala la présence du fluor dans l'organisme animal, en faisant l'analyse des dents d'un animal fossile : le mammouth.

Il utilisa, pour cette mise en évidence, une réaction connue depuis plus d'un siècle : on avait remarqué, en effet, dès la fin du ^{xvii}^e siècle que les fumées produites dans le traitement du spath-fluor par l'acide sulfurique attaquaient le verre.

MORICHINI rechercha également et décela du fluor dans les dents humaines ; il fit part de ses découvertes à GAY-LUSSAC qui, en 1805, refit l'expérience avec BERTHOLLET sur des défenses de sanglier et d'éléphant [51].

En 1818, BERZÉLIUS [10] confirma ces résultats.

Pourtant, la découverte de MORICHINI fut contestée par de nombreux auteurs et, en 1843, GIRARDIN rappelant que VAUQUELIN n'a pas trouvé de fluor dans les os et les dents, nie la présence de ce métalloïde dans les tissus normaux.

En 1850, WILSON signale le fluor dans le lait de vache et dans le sang de bœuf.

En 1888, il fut trouvé dans la coquille et le jaune de l'œuf ; dès cet instant, on imagine que le fluor possède un rôle physiologique important.

F. TAMMANN [90], J. BRANDL et H. TAPPEINER [14], A. JODLBAUER [62], E. ZDAREK [111] publient des résultats dont la variété et les différences s'expliquent par l'incertitude et le manque de précision des méthodes qu'ils emploient.

Ainsi, en 1857, NICKLÈS faisait remarquer une cause d'erreur due au fait que l'acide fluorhydrique n'est pas le seul acide susceptible d'attaquer le verre, et montrait que, dans certains cas, l'acide sulfurique aussi l'attaque — et il insistait sur la nécessité, pour la recherche du fluor, d'utiliser du quartz au lieu de verre quelconque.

A. CARNOT [17], en 1893, met au point un procédé de dosage qui lui permet de faire une étude du fluor dans les os contemporains et fossiles. Cette technique semble excellente à A. GAUTIER quand celui-ci commence ses recherches une quinzaine d'années plus tard.

En collaboration avec P. CLAUSSMANN [48], cet auteur met au point une technique minutieuse grâce à quoi il fait une étude très complète de la teneur en fluor de nombreux végétaux et tissus animaux.

A la suite de leurs recherches, les auteurs remarquèrent que, de même que le sodium, le potassium, le soufre et le phosphore, le fluor est très généralement répandu dans le règne végétal et le règne animal.

Pour le règne animal, A. GAUTIER et P. CLAUSSMANN [49] classent les divers tissus en trois séries, selon leur teneur en fluor :

a) *La peau et ses annexes* : épiderme, poils, cheveux, cornes, ongles, carapaces, écailles, émail dentaire, etc. contiennent le fluor en quantités abondantes, quoique très différentes.

Ces quantités varient de 180 mg. pour 100 g. de tissu sec, dans le cas de l'émail dentaire, à 6-20 mg. pour 100 g. dans les poils et cheveux, et 2-9 mg. dans les ongles et les cornes.

Le fluor augmente, pour un même tissu, avec l'âge, passe par un maximum chez l'adulte et diminue beaucoup dans la vieillesse (en particulier pour la teneur des cheveux et de l'émail dentaire).

Les auteurs remarquent enfin que les teneurs en fluor et en phosphore pour un tissu donné varient parallèlement sans toutefois être proportionnelles.

b) *Les os, cartilages et tendons* : Les auteurs ont, les premiers, dosé le fluor normal de divers types d'os et des différentes parties d'un os donné. Ils ont montré que les os plats sont les plus pauvres en fluor ; que dans les os longs, la diaphyse renferme environ cinq fois plus de fluor que les épiphyses. La teneur de l'os long chez l'homme adulte est ainsi de 50 mg. (pour 100 g. de tissu frais) dans la diaphyse et 11* mg. dans l'épiphyse ; chez le nouveau-né, ces teneurs sont respectivement de 15 mg., 6 et 3 mg., 7.

La variation du fluor est toujours, dans un même organe, concomitante de celle du phosphore.

Les tendons et cartilages sont les tissus les plus pauvres en fluor (de même en phosphates) puisqu'ils en renferment de 0 mg., 35 à 1 mg., 41 pour 100 g. de tissu frais.

c) *Cerveau, glandes, muscles, sang, lait, excrétiions* : Le fluor existe dans tous ces milieux, mais en quantités *très variables* suivant l'espèce et l'âge. Toutefois, les auteurs font remarquer « que pour un même tissu, chez les divers animaux, les quantités de fluor sont, à l'âge adulte, généralement du même ordre de grandeur et souvent presque les mêmes ».

A. GAUTIER et P. CLAUSMANN interprètent leurs résultats de la façon suivante :

— Tous les organes et tissus animaux *normaux* contiennent du fluor mais en proportions extrêmement variées, puisque la teneur de deux organes diffère de 0 mg., 15 à 180 mg. pour 100 g., c'est-à-dire dans une proportion de 1 à 1.200.

— L'abondance du fluor dans les organes de défense et d'excrétion (peau et annexes) est corrélative de la faible teneur en phosphore de ces organes et les rapports du fluor au phosphore ($1/7$, $1/5$ ou même $1/4,5$) sont les mêmes que ceux de ces deux éléments dans les phosphates fluorés naturels, par exemple dans l'apatite (où le rapport $\frac{F}{P} = 4,45$). Il semble donc que le fluor existe dans ces tissus d'excrétion sous une forme appelée à être rejetée au dehors.

Le squelette osseux, tissu de soutien, présente au maximum la richesse simultanée en fluor et en phosphore et le rapport $\frac{F}{P}$ y varie de 1/133 à 1/575.

Enfin, tandis que dans les organes d'excrétion le fluor semble destiné à la désassimilation directe ou indirecte, dans tous les autres organes (organes d'assimilation, de sécrétion ou d'activité mécanique : cerveau, glandes, muscles, etc.), le fluor est peu abondant et son rapport au phosphore varie de 1/350 à 1/1.433. Selon les auteurs, il aurait, dans ce second cas, un rôle de stimulant de l'assimilation du phosphore, dont il serait le « sensibilisateur ». D'ailleurs, il semble suivre le sort des phosphates alcalino-terreux dans l'émail des dents, les os, le sang, le lait, etc. Ainsi le lait de vache est quatre fois plus riche que celui de femme en fluor et en phosphate de chaux.

A. GAUTIER et P. CLAUSMANN [49] font encore remarquer que le sang est relativement riche en fluor — 3-4 mg. de fluor chez l'herbivore, 2 mg., 3 chez l'omnivore, pour 100 g. de sang sec — et que les excréments (urines, fèces) sont normalement très pauvres en fluor, puisque l'élimination est, pour l'homme, d'environ 1 mg. par 24 heures dans l'ensemble des excréments.

Depuis ces travaux, la question du fluor normal dans l'organisme est restée dans l'ombre jusqu'à ces dernières années où de nombreux chercheurs l'ont reprise pour l'opposer à celle du fluor existant après intoxication.

CHAPITRE II

**ACTION TOXIQUE DU FLUOR
ET DE SES DERIVES
IMPORTANCE DE LA TOXICOLOGIE
DU FLUOR**

L'action toxique du fluor et de ses dérivés s'est manifestée de façon tragique aux chercheurs qui, les premiers, tentèrent de préparer l'acide fluorhydrique et le fluor lui-même. C'est ainsi que THÉNARD et DAVY furent gravement incommodés par les fumées d'acide fluorhydrique dégagées accidentellement alors qu'ils essayaient de préparer du fluor pur. Plus tard NICKLÈS, puis le chimiste belge LOUYET en faisant des essais analogues, succombèrent à l'intoxication. A la même époque, WÖHLER fut atteint d'une grave dermatite imputable à l'acide fluorhydrique.

Depuis quelques années, on a signalé des cas d'empoisonnement du fait de dérivés du fluor que, jusqu'alors, on ne soupçonnait pas être toxiques. A côté de ces cas d'intoxication aiguë, on a constaté, en effet, une série d'accidents qui trouvent leurs sources dans les emplois multiples des dérivés du fluor pour les besoins industriels.

Après avoir reconnu les propriétés antiseptiques et germicides du fluor, on a pensé à l'utiliser à l'état de fluorure ou de fluosilicate pour la conservation de certaines denrées alimentaires et pour la destruction des insectes, et même des rongeurs. A. COBENZL [23] signale, en 1921, plusieurs insecticides utilisés sous les noms de « Schwabex », « Eralbin », « Floresan », constitués par des fluosilicates purs ou mélangés à du sesquioxyde de fer.

Cette propriété antiseptique a fait encore utiliser les fluorures dans les industries de distillation, pour prévenir et empêcher des fermentations secondaires ; par exemple dans la fabrication de l'alcool, l'acide fluorhydrique agit

à faible dose, et, sans nuire à l'action de la levure, pour arrêter les fermentations qui donnent naissance aux acides acétique, butyrique et lactique.

On conçoit que des dérivés fluorés, utilisés sans discernement dans des substances servant à l'alimentation, aient pu produire des accidents chez les consommateurs.

En 1922, O. LÜNING [66] relate le cas d'un ouvrier qui faillit absorber du café dans lequel une main malintentionnée avait mis, au lieu de sucre, un raticide à base de fluosilicate ; heureusement, l'homme percevant que la mixture présentait une saveur « particulière » renonça à l'absorber.

Pourtant la saveur du fluorure et du fluosilicate est faible ; et comme, d'autre part, on peut facilement se procurer ces produits pour la destruction des animaux nuisibles, ils se sont trouvés être la cause d'intoxications accidentelles dans plusieurs cas dont nous rappellerons quelques-uns :

En 1923, M. SOMMELET [87] décrit une intoxication qui semble être un des premiers cas d'empoisonnement accidentel imputable au fluor repéré en France : un restaurateur ayant acheté une poudre insecticide, celle-ci lui fut délivrée dans un sac en papier ; elle était blanche, d'aspect farineux. Après en avoir utilisé une partie, il abandonna le sac, non étiqueté, dans le coin d'une armoire. A quelque temps de là, sa femme prit dans le sac quelques cuillerées de ce qu'elle pensait être de la farine, pour faire une soupe qu'elle servit à deux clients. L'un, une femme, lui trouva un goût bizarre et s'en tint aux premières cuillerées ; mais l'autre, un homme, moins difficile, en absorba une assez grande quantité. Quelques heures après, tous les deux eurent des malaises, des vomissements, de la diarrhée, à la suite desquels l'homme succomba. L'expert commis à l'examen de la poudre, supposée toxique, en fit l'analyse chimique, et conclut, d'après le dosage des éléments qu'il y trouva, qu'elle était uniquement constituée de fluosilicate de sodium, établissant ainsi la toxicité, non encore connue de ce sel.

En 1931, J.-A. LABAT [64] cite un autre cas, pour lequel il fut mandé en qualité d'expert toxicologue. Il s'agissait d'une famille dont plusieurs membres avaient été intoxiqués après un repas que terminait un « clafoutis » : il y eut cinq malades, dont trois succombèrent. Dans les viscères de deux des victimes, ainsi que dans le gâteau incriminé, J.-A. LABAT [64] put mettre en évidence et caractériser un fluosilicate, cause de l'empoisonnement ; ce composé devait vraisemblablement se trouver dans la farine ayant servi à la confection du gâteau.

Dans l'industrie, les usines à superphosphates, qui utilisent, comme matière première, des phosphates naturels plus ou moins fluorés, peuvent laisser échapper dans l'atmosphère des fumées rendues toxiques par la présence d'acide fluorhydrique : en 1900, on a signalé en Prusse une série d'intoxications parmi les ouvriers d'une usine à superphosphates, accidents qui furent reconnus imputables à cet acide [27].

Enfin, on a, depuis quelques années, constaté des cas d'intoxication sur les animaux domestiques vivant au voisinage des usines d'aluminium du sud de la France.

Depuis les travaux de H. CRISTIANI et R. GAUTIER [27], [31] [32] [33], cette question semble élucidée. -

On utilise couramment, comme fondant, dans les usines à électrolyse de la bauxite, la cryolithe (fluorure double naturel d'aluminium et de sodium), et lors du traitement de ce minerai il y a dégagement abondant d'acide fluorhydrique. Or, ces fumées se condensent sur la végétation environnante, et la propagation peut être assez étendue puisque, selon BOULIN, cité par H. CRISTIANI [27], des fumées d'acide fluorhydrique dépolissent encore le verre à 2 km. de leur lieu d'émission. La fixation sur les plantes — ainsi que H. CRISTIANI et R. GAUTIER [31] l'ont montré — est d'autant plus facile que l'humidité atmosphérique est plus grande. Les animaux qui se nourrissent de ces plantes absorbent ainsi quotidiennement de petites doses de dérivés fluorés.

L'inhalation seule de gaz ne suffit pas à provoquer une intoxication grave ; en effet, les gaz inhalés sont fixés dès les premières muqueuses et éliminés. Il faut surtout qu'il y ait ingestion pour que se constate la fluorose ou, selon l'expression que lui a donnée H. CRISTIANI [36], la « cachexie fluorique ». Au voisinage des usines d'aluminium, on avait d'ailleurs remarqué que ces intoxications atteignaient seulement le bétail et non les hommes ; c'est qu'en effet l'animal absorbe directement les plantes qu'il consomme, tandis que l'homme les lave généralement avant de les utiliser ; grâce à cette précaution, il élimine les toxiques.

Cette « fluorose », ou intoxication chronique par les fluorures, se caractérise, chez l'animal, par une série de troubles, dont H. CRISTIANI donne les caractères suivants [36].

Sur les animaux vivant à proximité des usines d'aluminium, l'auteur observa un amaigrissement qui aboutissait à un état cachectique, avec raideur de la colonne vertébrale et des membres inférieurs ; de plus, il constata la diminution de la résistance osseuse, manifestée par les nombreuses et faciles fractures au cours de la maladie. Ces fractures répétées avaient conduit certains vétérinaires à diagnostiquer chez ces animaux une ostéomalacie ; ayant admis cette affection, ils ne supposaient pas que l'absorption de dérivés fluorés par inhalation, en pût être la cause.

H. CRISTIANI [29] [30] [34] [35] entreprit donc une étude systématique du phénomène sur des animaux soumis à un régime parfaitement équilibré, en ajoutant seulement à leur ration journalière soit une partie de fourrage provenant du voisinage des usines d'aluminium, soit du fourrage ordinaire qu'il avait arrosé de solution de fluorure ou de fluosilicate, ou saupoudré de ces mêmes sels à l'état solide. Il ne constata aucun symptôme dans la première phase de l'expérimentation, les animaux semblaient en parfait état de santé ; puis, au bout de quelques mois — et même d'une ou deux années, pour ceux qui recevaient de très faibles doses — l'expérimentateur vit apparaître dans tous les cas

de l'amaigrissement, de la raideur, de la cachexie enfin aboutissant à la mort, avec troubles du système nerveux central, notamment troubles bulbaires de la respiration et de la circulation.

A l'autopsie, il constata des lésions de la moelle osseuse, toujours très atrophiée ; l'os différait de l'os normal en ce qu'il était plus blanc, plus poreux, plus opaque et plus friable, et toujours plus fragile.

Toutefois, les os n'étaient jamais mous : il n'y avait donc pas d'ostéomalacie. L'examen chimique du tissu osseux décela une grande augmentation de la quantité de fluor par rapport à celle existant normalement.

Ce résultat coïncide avec celui fourni par J. BRANDL et H. TAPPEINER [14] : en analysant les os d'un chien soumis à une intoxication fluorique chronique, ces auteurs y trouvèrent une quantité de fluor notablement supérieure à celle qui existe normalement dans l'os.

D'autres accidents du même ordre ont pu être expliqués par la présence de fluor dans les roches naturelles. En 1933, P.-F. MOLLER et S.-V. GUDJONSSON [70] constatent, parmi les ouvriers d'une usine de Copenhague occupés au broyage et au traitement de la cryolithe, une série d'affections dues à l'exercice de leur profession. A côté de la silicose, expliquée par la présence de quartz dans la cryolithe, les auteurs signalent des affections osseuses décelables à la radioscopie et dues à l'accumulation du fluorure de calcium dans les os ; en même temps, les sujets malades présentent d'autres troubles pathologiques.

K.-D. JACOB et D.-S. REYNOLDS [61] ont recherché et dosé le fluor existant dans différents types de phosphates naturels d'Amérique ou d'Afrique du Nord ; ils y ont trouvé des quantités variant de 2,62 à 3,89 p. 100. Les eaux qui traversent de tels sols se chargent évidemment en dérivés fluorés, et ces eaux, utilisées pour l'alimentation de l'homme et des animaux, peuvent être la cause de fluoroses. C'est ce danger que signalait à l'Académie de Médecine, en 1933, H. VELU [100] à propos de l'intoxication fluorique transmissible aux jeunes animaux dans les élevages d'équidés con-

sommant des eaux où la teneur en fluor peut atteindre 10 mg. par litre.

H. VELU a de plus, confirmé expérimentalement certaines constatations antérieures des auteurs américains à propos de l'action nocive des phosphates naturels eux-mêmes :

E.-B. FORBES et ses collaborateurs [44] [45] avaient, en 1917, remarqué les effets des phosphates naturels sur la croissance et sur le développement du squelette en particulier, sans toutefois expliquer cette action.

E.-B. HART, H. STEENBOCK et F.-B. MORRISON, en 1927 [59], signalent des troubles de la reproduction qui seraient imputables à ces phosphates.

En 1928, O.-E. REED et C.-F. HUFFMANN [79] observent, chez la vache laitière soumise à une alimentation minérale à base de phosphates naturels, l'amaigrissement, la perte de l'appétit et enfin, des lésions dentaires, mais ne diagnostiquent pas le facteur causal de ces troubles. A ce moment, E.-B. FORBES [44] [45] estime qu'ils peuvent être expliqués par la forte teneur des phosphates en fluor.

Puis, Ch. TOLLE et L.-A. MAYNARD [93] font des expériences systématiques sur des rats, qu'ils alimentent avec des phosphates naturels et retrouvent chez ces animaux les lésions caractéristiques de l'intoxication fluorique, semblables à celles obtenues avec une ration renfermant 0,055 p. 100 de fluorure de sodium.

Ce sont ces essais qu'a repris H. VELU [97] [98], sur des rats blancs auxquels il fait absorber des phosphates naturels. Il constate aussi des accidents de fluorose et démontre que des composés très peu solubles du fluor (tel le fluorure de calcium qui entre pour 3 à 4 p. 100 dans la composition moyenne des phosphates naturels) peuvent avoir une action toxique sur l'organisme au même titre que les fluorures solubles. Pour cet auteur, le « darmous » nord-africain, décelé chez les animaux vivant sur des sols phosphatés et consommant les eaux qui traversent ces terrains, est une cachexie fluorique [99].

Cette opinion sur la toxicité de certaines eaux du fait du

fluor vient à l'encontre de celle exprimée par H. CRISTIANI en 1926, selon laquelle la teneur en cet élément des eaux de boisson ne pouvait être la cause d'une intoxication [24].

Au point de vue expérimental : C. BERGARA [9] a signalé des altérations des dents et des os chez des rats soumis à une intoxication chronique par les fluorures.

F.-J. MAC CLURE et H.-H. MITCHELL [67] ont montré qu'une dose de 0,03 à 0,06 p. 100 de fluor, administrée à des rats, sous forme de fluorure de sodium ou de calcium, donnait lieu à des lésions dentaires caractéristiques. Les mêmes auteurs n'ont pourtant observé aucun changement d'aspect des dents de porcs soumis à une alimentation fluorurée semblable [68].

J. CHANELES a étudié l'action de la fluorose expérimentale sur des rats blancs, qu'il partage en deux lots : les uns et les autres reçoivent, par ingestion, des quantités de fluorure pendant un temps prolongé, mais l'un des groupes est, en même temps, soumis à l'action des rayons ultraviolets [18] [19]. L'auteur constate que, dans le lot non irradié, l'action nocive sur les dents se manifeste beaucoup plus vite que dans le second, et admet que, le fluor ayant une action de fixation sur le calcium, cette action est ralentie par les rayons ultraviolets.

C.-Y. CHIANG, P.-H. PHILIPS et E.-B. HART [20] ont administré à des vaches laitières des phosphates bruts mélangés à leur ration journalière, et constaté chez ces animaux une augmentation notable du taux normal du fluor dans les divers organes et, en particulier, dans les os et les dents, dont la teneur peut être multipliée vingt-cinq fois. Les auteurs montrent que le fluor n'est presque pas excrété, mais fixé par insolubilisation parallèlement au calcium et au phosphore. Cette remarque est en harmonie avec la théorie d'A. GAUTIER et P. CLAUSMANN sur le rôle du fluor chez les êtres vivants [49].

M.-C. SMITH, E.-M. LANTZ et H.-V. SMITH [86] signalent dans certaines régions la nocivité d'eaux potables renfermant de 3 mg., 8 à 7 mg., 15 par litre de fluorure, dont

l'action se manifeste par des affections dentaires dites « mottled enamel » (email tacheté) sévissant à l'état endémique chez les habitants de ces régions.

H.-V. CHURCHILL [22] signale des teneurs en fluor de 2 mg. à 13 mg., 7 par litre dans des eaux dites « potables » et qui, cependant, causent les mêmes accidents dentaires.

Ces auteurs appuient d'ailleurs leurs dires sur ce fait que dans les régions où l'on ne rencontre pas l'émail tacheté, l'analyse des eaux de boisson a toujours décelé des teneurs en fluor bien inférieures à celles que nous venons de citer (< 1 mg. litre).

Si le fluor des roches et des eaux naturelles peut être, on le voit, une source d'intoxication chronique, il existe aussi des cas où des substances végétales pourraient être la cause d'empoisonnements, par le fluor qu'elles contiennent.

A. GAUTIER et P. CLAUSMANN [50], qui ont analysé systématiquement de nombreux végétaux comestibles, trouvent une teneur moyenne de 0,00265 p. 100 de fluor dans les substances fraîches.

A.-G. WOODMAN et H.-P. TALBOT [110], en analysant des bières, trouvent que la présence de fluor est la règle et que cet élément a sa source dans le malt lui-même : selon ces auteurs, la limite supérieure du fluor autorisée dans les bières, doit être fixée à 10 mg. par litre.

Nous venons de voir que l'intoxication fluorique chronique était lente et que les symptômes en étaient souvent tardifs. Elle ne se manifeste, en général, que lorsqu'elle est déjà effective. H. CRISTIANI a appelé « période larvée » cette première phase de l'intoxication, et attiré l'attention des hygiénistes sur le danger qu'elle dissimule [25].

On comprend, dans ces conditions, l'intérêt qu'il y a à dépister et à doser de façon précoce le fluor, tant au voisinage des usines que dans les eaux servant à l'alimentation courante.

Etant donné l'importance des intoxications chroniques dont nous venons d'essayer de donner une idée, la recherche et le dosage de faibles quantités de fluor prennent un

intérêt incontestable. C'est dans cette voie que nous avons orienté nos travaux. Nous avons tenté de mettre au point une technique susceptible d'être utilisée en toxicologie. Dans ce but, il importait d'abord d'isoler le fluor des liquides biologiques ou des organes ; puis, cet isolement réalisé, de titrer cet élément aux doses infinitésimales auxquelles une intoxication chronique peut être due.

CHAPITRE III

METHODES DE DOSAGE DU FLUOR

Étude de quelques micro-méthodes

Nous allons passer en revue quelques procédés de dosage du fluor, et voir dans quelle mesure ils sont susceptibles d'être utilisés pour de petites quantités de cet élément.

De nombreuses méthodes ont été préconisées et, depuis quelques années particulièrement, la littérature en donne de fréquents exemples.

A. — DOSAGE PAR PRECIPITATION ET PESEE.

Du point de vue du macro-dosage de ce métalloïde, P. MOUGNAUD [72] a, en 1931, fait paraître une étude critique et détaillée des diverses méthodes utilisées jusqu'alors. Il a étudié plus spécialement et mis au point, parmi les méthodes pondérales, celle qui lui semblait la meilleure : elle est basée sur la précipitation du fluor à l'état de fluorure de calcium en milieu neutre, suivie de calcination et de pesée du précipité ; cette méthode est rapide et donne d'excellents résultats à 1 p. 100 près pour des doses de fluor de l'ordre du décigramme ou davantage,

Il est bien évident que ce procédé ne saurait être applicable à de très faibles quantités de fluor ; en effet, la solu-

bilité du fluorure de calcium dans l'eau que P. MOUGNAUD [72] a reconnue être de 15 à 18 mg. par litre, suivant que le produit est calciné ou seulement séché à l'étuve, est à peu près négligeable quand il s'agit de doser quelques décigrammes de fluorure, mais devient gênante quand le dosage porte sur quelques milligrammes ou moins.

B. — DOSAGE APRES VOLATILISATION A L'ETAT DE FLUORURE DE SILICIUM.

D'autres procédés de dosage mettent à profit la volatilisation du fluor, en milieu acide et en présence de silice, à l'état de fluorure de silicium, selon l'équation :



Ce gaz, reçu au contact d'eau, donne naissance à de l'acide hydrofluosilicique et à de la silice :



Ces réactions permettent un dosage soit pondéral, soit volumétrique.

a) Dosage pondéral.

La pesée de la silice formée a été utilisée par F. WOELIER [108], H. LASNE [65], S. BEIN [8], P.-E. BROWNING [15], etc.

D'autres auteurs, A. CARNOT, [16], par exemple, reçoivent le fluorure de silicium dans une solution de fluorure de potassium et pèsent le fluosilicate de potassium obtenu.

C.-R. WAGNER et W.-H. ROSS [106] après volatilisation du fluorure de silicium, pèsent l'acide fluorhydrique à l'état de chloro-fluorure de plomb.

La critique de ces procédés a été faite. On les a reconnus d'application délicate, car le précipité formé est toujours

gélatineux et difficile à rassembler ; de plus leur précision est assez douteuse.

b) Dosage volumétrique.

A côté de ces méthodes pondérales, d'autres auteurs ont établi un dosage volumétrique du fluor après sa volatilisation à l'état de fluorure de silicium, l'acide hydrofluosilicique formé au contact de l'eau pouvant être titré acidimétriquement.

Les uns opèrent par voie indirecte ; ainsi A. HILLEMANN [60] reçoit le fluorure de silicium dans un mélange d'iode et d'iodate de potassium dont il titre l'iode libéré par l'acide hydrofluosilicique.

S.-L. PENFIELD [76] puis W.-D. TREADWELL [94] recueillent le fluorure de silicium dans une solution alcoolique de chlorure de potassium. L'acide hydrofluosilicique d'abord obtenu se transforme en son sel de potassium, en même temps qu'il libère de l'acide chlorhydrique titrable par la soude. Une mise au point de la technique de PENFIELD [76] a été faite récemment par C.-G. SCHWALBE et G. JUST [84], qui ont construit un appareil à fond poreux permettant, au moyen de l'air comprimé, d'entraîner la totalité du fluorure de silicium.

H. OFFERMANN [74], N. SAMBOM et F.-W. HINRICHSSEN [81], L. SCHUCHT et W. MÖLLER [83], puis W.-H. ADOLPH et P. DRAWE [1] titrent l'acide hydrofluosilicique par la potasse, selon la réaction :



En effet, l'acide hydrofluosilicique traité par la potasse donne, selon le mode opératoire, soit son sel de potassium, soit de la silice et du fluorure de potassium :



C'est la première réaction qui sert de base aux dosages pratiqués par PENFIELD [76] et par TREADWELL [94]. Elle se fait à froid en milieu éthero-alcoolique.

La deuxième réaction, base du dosage d'OFFERMANN [74], peut être considérée comme la somme de la première et de la décomposition du fluosilicate de potassium d'abord formé, selon l'équation :



Celle-ci se fait à chaud en milieu aqueux, après évaporation de l'éther et de l'alcool.

Donc, la solution renfermant l'anion fluosilicique étant neutralisée dans les conditions de (1), redevient acide si l'on se place dans les conditions de (2), et il faut ajouter la quantité d'alcali déterminée par (3) pour rétablir la neutralité. Ainsi (3) est caractéristique de l'anion fluosilicique, et le dosage peut se ramener à une mesure volumétrique de la quantité d'alcali correspondant à (3). Ceci constitue le principe du dosage pratiqué par E. BAYLE et L. AMY [7].

Pour les fluorures, les auteurs opèrent en faisant une distillation, en présence d'acide sulfurique concentré et de silice en milieu très sec ; ainsi tout le fluor est volatilisé à l'état de fluorure de silicium qu'on reçoit dans l'eau. L'acide hydrofluosilicique formé est titré comme nous venons de l'exposer.

Nous avons voulu voir si cette méthode était applicable à un micro-dosage. A cet effet, nous avons construit un appareil composé d'un ballon à distiller, relié d'un côté à une série de flacons-laveurs renfermant de l'acide sulfurique, et, de l'autre, à un vase renfermant de l'eau distillée ; ce vase était mis en relation avec une trompe à vide qui réalisait dans l'appareil, l'aspiration de l'air desséché par barbotage dans l'acide sulfurique.

Nous avons suivi le mode opératoire préconisé par E. BAYLE et L. AMY [7]. Après avoir fait passer le courant

d'air sec une demi-heure à froid dans le ballon contenant l'échantillon de fluorure séché à l'étuve, de la silice et de l'acide sulfurique, on chauffe peu à peu jusqu'à 160° et l'on maintient cette température pendant 5 heures. Le liquide du vase récepteur est traité par du chlorure de potassium en excès, de l'alcool et de l'éther à froid et quand la précipitation du fluosilicate de potassium est faite, neutralisé par la potasse en présence de phtaléine. On porte alors au bain-marie en présence de solution de chlorure de calcium qui facilite la décomposition du fluosilicate. L'éther puis l'alcool s'évaporent et, la décomposition se faisant à chaud, le milieu redevient acide ; la phtaléine se décolore ; on neutralise à nouveau par la potasse et le volume d'alcali utilisé cette fois correspond à la réaction. (3). [Voir page 38.]

Résultats :

Des essais faits sur quelques décigrammes de fluorure de sodium ne nous ont pas donné d'excellents résultats : il y avait toujours environ 10 p. 100 de pertes.

Pour des doses de quelques centigrammes, les résultats obtenus ne décelèrent que 70 à 80 p. 100 du fluor mis en œuvre.

Enfin, sur des doses de l'ordre du milligramme et en opérant à la micro-burette avec de la potasse décinormale, nous retrouvâmes souvent la moitié seulement du fluorure ou même moins.

Ces mauvais résultats sont dus à la difficulté qu'il y a pratiquement à obtenir un milieu parfaitement sec. L'appareil que nous avons utilisé était certainement imparfait : il comportait des bouchons de liège qui peuvent toujours retenir des traces d'humidité et, de plus, l'échantillon lui-même et les réactifs sont difficiles à dessécher complètement. Quand il s'agit de titrer de très petites quantités de fluorure, on conçoit qu'une partie importante en puisse être retenue et que les pertes soient, relativement, très grandes.

W.-D. ARMSTRONG [4], dans une étude sur la volatilisation du fluorure de silicium, a mis en évidence cette cause d'erreurs et construit, pour faire la volatilisation du fluorure de silicium, un appareil tout en verre dont les dernières traces d'eau peuvent être éliminées par chauffage à la flamme avant de commencer l'opération ; de plus, le ballon à réaction peut être agité pendant l'opération. L'auteur, en observant toutes ces précautions et en titrant, par la méthode colorimétrique qu'il a mise au point, l'acide hydrofluosilicique formé dans ces conditions, obtient des résultats s'échelonnant entre 98 et 100 p. 100 sur des échantillons de fluorure de sodium de l'ordre du décigramme ou du centigramme, mais ne parle pas de doses plus petites.

D'autre part, la méthode de E. BAYLE et L. AMY [7] est inapplicable quand l'échantillon renferme des chlorures, car l'acide chlorhydrique, libéré en même temps que le fluorure de silicium, acidifie la liqueur et le dosage à la potasse n'a plus de signification quant à l'acide hydrofluosilicique ; or, dans les milieux biologiques, on est toujours en présence de chlorures. Cette considération, en même temps que la difficulté — sinon l'impossibilité — d'obtenir de bons résultats, nous a fait abandonner nos essais sur l'extension de la méthode de E. BAYLE et L. AMY [7] au micro-dosage du fluor.

C. — DOSAGE APRES VOLATILISATION A L'ETAT D'ACIDE HYDROFLUOBORIQUE.

Quelques auteurs ont préconisé, pour entraîner le fluor d'un mélange, sa combinaison avec l'acide borique et la volatilisation à l'état d'acide fluoborique.

Ainsi, W.-T. SCHRENK et W.-H. ODE [82], pour titrer la silice en présence de fluor, utilisent, pour séparer ce dernier, le mélange d'acide borique et d'acide perchlorique et dans le distillat, titrent le fluor au moyen de nitrate de thorium étalonné. Ils obtiennent de bons résultats, ce qui sem-

blerait indiquer que la volatilisation boro-perchlorique entraîne bien la totalité du fluor du mélange.

H.-H. WILLARD et O.-B. WINTER [107] ont repris cette technique et, en faisant varier les données du dosage — temps de distillation, température, quantités de réactifs utilisées, etc. — ils obtinrent des résultats assez inconstants ; dans quelques cas seulement ils retrouvèrent la totalité du fluor existant. Ces auteurs remarquèrent que l'emploi de l'acide sulfurique était préférable à celui de l'acide perchlorique et trouvèrent que la meilleure technique consistait à distiller à température assez basse ($\leq 130^\circ$) et à prolonger la distillation jusqu'à obtention de 200 à 250 cm³ de distillat.

Cependant, H.-H. WILLARD et O.-B. WINTER [107] affirment que « pour quelque raison inexplicquée », plusieurs dosages conduits de façon parallèle donnèrent des résultats très différents et que de meilleures conditions sont à déterminer pour doser le fluor au moyen de sa combinaison borique.

D. — DOSAGE PAR GRAVURE.

Un certain nombre de procédés employés autrefois pour le dosage de petites quantités de fluor utilisait la propriété caractéristique que possède l'acide fluorhydrique de roder et de graver le verre, en agissant sur la silice pour former du fluorure de silicium ; les auteurs opéraient par comparaison avec des témoins. Ainsi, OLIVIER utilise, pour doser dans les blends de petites quantités de fluor, la comparaison sur verre de montre des anneaux dépolis par l'acide fluorhydrique obtenu, en creuset de platine, par action d'un acide sur le minerai sec. (*Cité par Mme H. DIDIER* [39].)

Dès 1906, A.-G. WOODMAN et H.-P. TALBOT [109] avaient remarqué que la température a un rôle prépondérant sur le dégagement de l'acide fluorhydrique dans ces conditions et qu'il importait de faire l'essai toujours à la même tempé-

rature. Récemment, cette méthode a été essayée à nouveau par Mme H. DIDIER [39] pour la recherche du fluor dans les organes après destruction nitrique. L'auteur donne, comme limite de sensibilité pour la recherche, 0 mg., 01 de fluor, mais obtient des résultats assez inconstants quand il s'agit du dosage.

E. — DOSAGE APRES VOLATILISATION A L'ETAT D'ACIDE HYDROFLUOSILICIQUE.

Toute une série de procédés utilise, pour isoler le fluor des milieux complexes, sa volatilisation non plus à l'état de fluorure de silicium mais à l'état d'acide hydrofluosilicique, le dosage étant ensuite pratiqué par une technique, soit volumétrique, soit colorimétrique.

H.-H. WILLARD et O.-B. WINTER [107] les premiers, ont opéré l'isolement du fluor de cette façon. Ils mettent la solution de fluorure dans un ballon à distiller, avec quelques centimètres cubes d'acide perchlorique, de petits fragments de verre et de l'eau en quantité suffisante pour que le mélange entre en ébullition à 110° ou au-dessous. Ils laissent distiller jusqu'à ce que le point d'ébullition monte à 135° et maintiennent cette température, en ajoutant de l'eau pendant le temps nécessaire à l'obtention de 50 à 75 cm³ de distillat qui renferme tout le fluor. Ils neutralisent et titrent le fluor par un procédé volumétrique.

Le procédé volumétrique de H.-H. WILLARD et O.-B. WINTER [107] est basé sur les principes suivants :

Le fluor est précipitable par le nitrate de thorium, en donnant du fluorure de thorium insoluble en solution alcoolique. L'indicateur utilisé est un mélange de nitrate de zirconium et de rouge d'alizarine. Selon les auteurs, quand, à une solution très diluée de fluorure, on ajoute quelques gouttes du mélange coloré, la couleur s'affaiblit lentement jusqu'à ce qu'un complexe « zirconium-fluor » soit obtenu et alors la teinte disparaît brusquement.

Cette observation permet d'utiliser le mélange comme indicateur. Il y a recoloration dès que tout le fluor a dis-

paru du mélange sous forme de fluorure de thorium, insoluble dans l'alcool.

Le mode opératoire qu'indiquent les auteurs est le suivant :

Dans un vase à précipité, on met une portion aliquote de la solution de fluorure à titrer. On ajoute assez d'eau pour obtenir un volume de 20 cm^3 , puis 3 gouttes de la mixture indicatrice (le mélange des deux solutions de zirconium et d'alizarine étant fait extemporanément). S'il est nécessaire, on ajoute de l'acide chlorhydrique dilué en quantité suffisante pour détruire la coloration ; puis un égal volume d'alcool éthylique et on titre le mélange au moyen de solution étalonnée de nitrate de thorium, jusqu'à faible réapparition de la couleur. On apprécie mieux la recoloration en se plaçant sur un fond blanc. La réaction est lente quand on approche de la fin.

C.-S. BORUFF et G.-B. ABBOTT [13] utilisent pour doser les fluorures dans les eaux de l'Illinois, un procédé analogue : volatilisation à l'état d'acide hydrofluosilicique et dosage volumétrique au moyen du nitrate de thorium, en présence du rouge d'alizarine.

Nos essais nous ont montré que, préparé dans les conditions déterminées par H.-H. WILLARD et O.-B. WINTER [107], l'indicateur, à raison de trois gouttes dans les 40 à 50 cm^3 du mélange, fournit une coloration très faible dont la disparition est difficile à constater ; de plus, le virage est lent et assez imprécis. En faisant plusieurs dosages dans les mêmes conditions, le virage de l'indicateur était obtenu avec des quantités variables de nitrate de thorium l'écart entre les chiffres trouvés atteignait facilement 10 p. 100.

Pour ces raisons nous avons abandonné ce procédé.

Tout à fait comparable au procédé volumétrique de H.-H. WILLARD et O.-B. WINTER [107], est celui de F.-J. FRÈRE [47], qui, pour doser le fluor dans la cryolithe, emploie le nitrate d'yttrium préalablement étalonné en présence de rouge de méthyle comme indicateur.

F. — DOSAGES COLORIMETRIQUES.

a. A. GAUTIER et P. CLAUSMANN [48], après avoir séparé le fluor à l'état de fluorure de baryum, en libèrent l'acide fluorhydrique qu'ils transforment en son sel de potassium, puis en fluorure de plomb, dont ils dosent le plomb colorimétriquement à l'état de sulfure noir colloïdal.

Cette méthode qui a donné de bons résultats entre les mains de leurs auteurs et qui, de plus, est sensible puisque, selon eux, elle permet de déceler avec sécurité 0 mg., 1 de fluor dans 100 g. de tissu végétal ou animal, a l'inconvénient de nécessiter un matériel très spécial et coûteux et, de l'aveu même des auteurs, une pratique longue et délicate.

b. Enfin, de nombreux procédés de micro-dosage mettent en œuvre des réactions colorées. Ainsi G. STEIGER [88], puis H.-E. MERWIN [69] utilisent la propriété que possèdent les solutions de fluorure d'affaiblir l'intensité de la coloration jaune orangé que provoque l'eau oxygénée avec une solution d'un sel de titane.

Plus récemment, L. SZEGOE et B. CASSONI [89] séparent le fluor, soit en milieu sec par volatilisation à l'état de fluorure de silicium — après l'avoir rassemblé dans un précipité de fluorure de baryum — soit par volatilisation à l'état d'acide hydrofluosilicique au moyen d'un procédé analogue à celui de H.-H. WILLARD et O.-B. WINTER [107], puis le dosent au moyen d'une solution m/40 de sulfate de titane additionnée de perhydrol, par comparaison colorimétrique avec un témoin, au photomètre de PULFRICH.

I.-M. KORENMANN [63] utilise cette même réaction colorée : avec une solution donnée de sulfate de titane il fait une série d'essais colorimétriques au moyen de solutions de fluor de teneurs connues et, comme l'affaiblissement de la coloration n'est pas proportionnel aux quantités de fluor, il construit une courbe témoin au moyen des essais effectués ; cette courbe sert ultérieurement à la comparaison d'un essai inconnu traité par la même solution de titane.

E. PEYROT [77] isole le fluor dans l'appareil à volatilisation du fluorure de silicium de S.-L. PENFIELD [76] en milieu sec et le dose aussi par la méthode au sel de titane et à l'eau oxygénée, au moyen d'un colorimètre, ou, à défaut, d'une échelle de teintes dont la coloration des termes est inversement proportionnelle au carré de la concentration en fluor.

c. M.-D. FOSTER [46] utilise, pour doser colorimétriquement les fluorures dans l'eau, une méthode basée sur la propriété que possèdent ces sels de former un complexe avec le fer trivalent en présence de thiocyanate. La partie du fer qui a formé le complexe avec le fluorure est soustraite à l'action du thiocyanate et il en résulte un affaiblissement de la coloration du thiocyanate ferrique.

Cette même propriété du fluor de se combiner au fer ferrique en donnant un complexe ne fournissant aucune couleur avec les différents réactifs du fer, avait servi de base à P. GUYOT [58], à A. GREEFF [57], à W.-D. TREADWELL et A. KOHL [95], à J.-G. FAIRCHILD [42], enfin à W.-D. ARMSTRONG [3], pour une technique qui, selon ce dernier « permet le dosage colorimétrique de micro-quantités de fluor en présence de substances qui contrarient les autres méthodes ».

W.-D. ARMSTRONG [3] utilise l'affaiblissement de coloration du dérivé ferrique de l'acétylacétone par les fluorures et, l'acidité, la présence d'impuretés jouant un rôle dans cet affaiblissement, il compare l'effet produit par une partie aliquote de la solution à celui que produit la même partie aliquote additionnée d'une quantité connue de fluorure.

Un autre procédé utilisant le chlorure ferrique a été préconisé par B. VISINTIN [105], pour le dosage de petites quantités d'acide fluorhydrique. Cet auteur utilise le chlorure ferrique en présence de sulfocyanure et de bleu de bromophénol en milieu éthéro-alcoolique ; le chlorure ferrique se combine au fluorure pour former un complexe dont le fluor est libérable par l'action à chaud du carbonate de sodium, ce qui permet un contrôle.

d. La destruction par les fluorures de la coloration rouge-violet du mélange zirconium-alizarine qu'utilisent comme indicateur, H.-H. WILLARD et O.-B. WINTER [107], a servi, pour d'autres auteurs, à un dosage colorimétrique simple. C'est ainsi que T.-G. THOMPSON et J.-H. TAYLOR [92] procèdent, pour doser les fluorures dans l'eau de mer, en se basant sur la réaction appliquée par J.-H. DE BOËR et J. BASART [12] en 1926, d'après le principe donné par J.-H. DE BOËR [11] en 1925.

Cet auteur a montré que le complexe rouge-violet que forme l'alizarine-sulfonate de sodium avec un sel de zirconium est altéré par divers acides en fournissant un complexe jaune ; or, l'acide fluorhydrique agit à des doses beaucoup plus faibles que les autres, ce qui permet d'utiliser le changement de coloration du rouge au jaune pour son dosage.

R. CHARONNAT et Mlle S. ROCHE [21] utilisent cette méthode pour le dosage du fluor dans les eaux minérales.

G. - DOSAGE BASE SUR UNE PROPRIÉTÉ PHYSIQUE.

a) Caractéristique spectroscopique.

Les travaux de J. VILLE et E. DERRIEN [101] [102] [103] ont montré que le spectre de la méthémoglobine, caractérisé normalement par quatre bandes dont la plus importante est située dans le rouge, se modifie par addition de fluorure, avec déplacement de la bande du rouge vers l'orangé, en même temps que la nouvelle bande devient plus foncée pour une même concentration de la solution. Les auteurs signalent ce fait comme pouvant servir à la fois à la recherche de la méthémoglobine et à celle des fluorures et mettent au point un procédé de recherche des antiseptiques fluorés dans les substances alimentaires, basé sur cette propriété [104].

b) Conductibilité électrique.

Parmi les micro-dosages du fluor basés sur une propriété physique, on peut citer une méthode se ramenant à l'évaluation de la conductibilité électrique de la solution à titrer à mesure qu'on y ajoute un réactif précipitant. C'est ce procédé qu'ont employé J. PICCARD et C. BUFIAT [78] pour titrer le fluor dans le fluoré-benzène.

Dans une étude critique, P. MOUGNAUD [72] a montré que cette méthode était peu précise et d'application assez difficile.

c) Potentiométrie.

R. FLATT [43], en 1933, a cité une méthode de dosage micro-potentiométrique du fluor mise au point par W. HESS. Elle consiste à titrer une solution de fluorure de potassium, en présence de tampons, avec une solution sulfurique de sulfate uraneux. Il y a un saut de potentiel au moment de la formation du fluorure double d'uranium et de potassium UF_6K et la mesure de cette différence de potentiel permet, selon les auteurs, d'obtenir un bon dosage pour quelques dixièmes de milligramme de fluor contenus dans 5 cm³ d'eau.

Cette étude des micro-dosages du fluor nous a conduite à mettre l'un d'eux au point, afin de l'appliquer à la toxicologie.

II

Recherche d'une méthode applicable à la toxicologie

A. — METHODE SPECTROPHOTOMETRIQUE.

Nous avons vu que J. VILLE et E. DERRIEN [101] [102] [103], après avoir montré l'action des fluorures sur le spectre de la méthémoglobine, avaient appliqué cette propriété à la recherche des antiseptiques fluorés dans les substances alimentaires [104].

Sur les conseils de notre Maître, le Professeur FABRE, nous avons tenté d'utiliser cette propriété spectrographique, non plus seulement pour la recherche, mais de façon quantitative, et mis au point la méthode de dosage spectrophotométrique du fluor, que nous allons développer.

Il était nécessaire de préciser la position de la bande d'absorption intéressante ; d'évaluer dans quelle mesure l'addition de petites quantités de fluorure à la méthémoglobine en faisait varier l'intensité ; enfin, de rechercher la limite d'utilisation de cette propriété. Nous nous sommes servie, pour tous nos travaux, du spectrophotomètre d'Yvox, appareil dont nous rappellerons brièvement le principe et le fonctionnement :

Quand un faisceau lumineux traverse une solution colorée, certaines de ses radiations sont absorbées par la solution. Cette absorption peut se traduire par la diminution d'éclairement de la plage située à l'extrémité du faisceau, or, cette diminution est susceptible d'être comparée, au moyen de l'œil, avec celle que subit un second faisceau

lumineux passant par un système de nicols, dont l'un est fixe et l'autre mobile, réalisant tous les stades d'éclairement depuis le maximum (quand les deux nicols sont parallèles) jusqu'à l'extinction (quand les deux nicols sont croisés).

On obtiendra, pour un point déterminé du spectre, l'égalité d'éclairement de la plage correspondant à la solution et de celle relative au témoin en faisant tourner le nicol mobile, et l'angle de rotation mesurable sera fonction de l'absorption de la solution, pour le point considéré, c'est-à-dire de sa densité optique. Grâce à un prisme que gouverne un cercle mobile gradué en longueurs d'ondes, on peut faire cette mesure systématiquement pour toutes les régions du spectre et les différentes densités optiques obtenues permettront de construire la courbe d'absorption de la solution étudiée, pour la région du spectre correspondant aux longueurs d'ondes considérées.

L'utilisation du spectrophotomètre consiste donc, après réglage et mise au point de l'appareil, à établir l'égalité d'éclairement des deux plages pour un point donné du spectre, puis à lire l'angle de rotation correspondant, et à répéter ces opérations pour toutes les longueurs d'ondes intéressantes. Comme pour tous les appareils d'optique utilisant l'œil, une certaine pratique est nécessaire à celui qui travaille au spectrophotomètre pour acquérir la sensibilité et la constance dans les observations. Notre premier effort a été d'acquérir cette pratique.

Nous avons commencé nos essais en observant différents échantillons de méthémoglobine.

Rappelons que la méthémoglobine est un pigment sanguin oxygéné, dont la teneur en oxygène est la même que celle de l'oxyhémoglobine. La différence essentielle entre ces deux pigments est que, dans la méthémoglobine, l'oxygène est lié beaucoup plus solidement à la molécule, ce qui le prive de ce rôle de « transporteur d'oxygène » qui caractérise l'oxyhémoglobine : la méthémoglobine n'est pas un pigment respiratoire.

Ceci explique que, dans certaines intoxications où le poison a une action méthémoglobinisante sur les globules

sanguins — et ce cas est fréquent — il y ait mort par asphyxie si une partie assez grande de l'oxyhémoglobine est transformée.

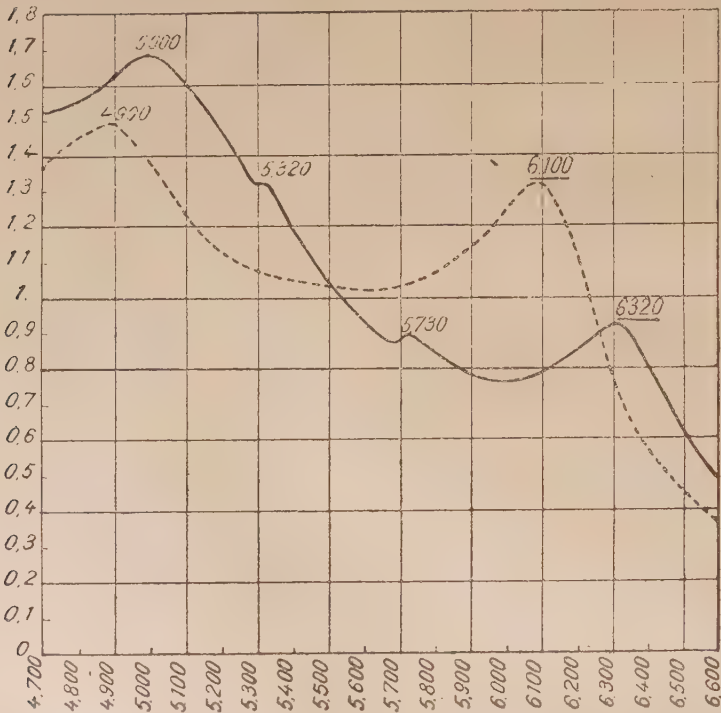


Fig. 1. - Courbes d'absorption de la méthémoglobine et de la méthémoglobine fluorée.

En abscisses : longueurs d'onde en unités Angström.

En ordonnées : densités optiques.

Courbe en trait plein : Méthémoglobine.

Courbe en pointillé : Méthémoglobine précédente fluorée.

Le spectre de la méthémoglobine en milieu acide est caractérisé par 4 bandes [37] : l'une, assez large, dans le bleu, aux environs de la longueur d'onde (λ) 5.000 unités Angström (U. Å.) ; une autre, très bien délimitée dans le rouge avec maximum à $\lambda = 6.300$ U. Å. ; enfin, deux bandes beaucoup plus estompées, souvent difficiles à voir, sont situées dans le vert et le jaune aux $\lambda = 5.300$ et 5.700

U. Å., c'est-à-dire dans la zone des bandes de l'oxyhémoglobine. On peut observer un tel spectre en additionnant du sang frais de quelques cristaux de ferricyanure de potassium, triturant au mortier et faisant avec la bouillie brune obtenue une solution au 1/50 environ, comme le préconise B. VON REINOLD [80]. Sa courbe d'absorption, faite au spectrophotomètre, accuse, par des inflexions, la position de ces quatre bandes, et manifeste l'importance prépondérante de la bande du rouge (fig. 1).

A cette solution, on ajoute une pincée de fluorure de sodium et l'on agite. Aussitôt la solution brune prend un aspect verdâtre et, observée au spectrophotomètre, n'offre plus que deux bandes d'absorption : l'une, dans le bleu, assez large et imprécise, à $\lambda = 4.900$ U. Å., est voisine de celle de la méthémoglobine ; l'autre, beaucoup plus nette et bien délimitée, située dans le rouge à la limite de l'orangé, caractérise la combinaison « méthémoglobine fluorée » et a reçu l'appellation de « bande de Menzies », du nom de son premier observateur. Son maximum est situé à $\lambda = 6.100$ U. Å.

La courbe (fig. 1) de la méthémoglobine fluorée exprime nettement le changement de position de la bande de la méthémoglobine, dans le rouge, ainsi que son intensité beaucoup plus grande.

La méthémoglobine préparée par le procédé au ferricyanure est instable et s'altère rapidement. Nous l'avons constaté en faisant le tracé de sa courbe d'absorption à différentes périodes :

24 heures après sa préparation, la méthémoglobine possède encore la bande dans le rouge, mais déjà moins intense que la veille (à son maximum, la densité optique à $\lambda = 6.100$ U. Å. est un peu inférieure) ; cet affaiblissement s'accroît et, après 3 jours, la densité optique, qui était primitivement de 1,50 a passé à 1,29. Après 7 jours, il y a déjà modification de la courbe ; la densité optique, pour 6.300 U. Å., est descendue à 1,17 et, en même temps que la bande dans le bleu a disparu, il se forme dans le vert une bande ayant son maximum à $\lambda = 5.300$ U. Å. Après

10 jours, cette bande dans le vert subsiste, tandis que celle à $\lambda = 6.100$ U. Å. n'est plus qu'à peine indiquée par la courbe.

Enfin au bout de 15 jours, la courbe ne présente plus d'inflexion dans le rouge et, au bout de 25 jours, la méthémoglobine, entièrement détruite, ne peut plus être décelée au spectrophotomètre. Sa courbe d'absorption est à peu près rectiligne et insignifiante.

Il nous était indispensable d'avoir de la méthémoglobine en solution stable pour nos essais. Deux procédés s'offraient à nous :

1° Procédé de M. NICLOUX et G. FONTÈS [73]. Ces auteurs après avoir étudié quelques modes de formation de la méthémoglobine, ont indiqué, pour sa préparation, le procédé suivant :

On ajoute peu à peu, à du sang de bœuf défibriné, 10 p. 100 en volume d'alcool à 95° ; on laisse le mélange en contact une semaine à l'étuve à 37°, ou 6 semaines à la température du laboratoire. Les auteurs estiment qu'au bout de ce temps toute l'hémoglobine s'est méthémoglobinisée, et le produit est imputrescible.

Nous avons obtenu, par ce procédé, un produit qui présentait bien le spectre caractéristique de la méthémoglobine, mais qui ne nous a pas donné satisfaction après addition de fluor : en effet, dans le spectre de la méthémoglobine fluorée, nous avons toujours observé deux bandes plus ou moins nettes à $\lambda = 5.300$ U. Å. et $\lambda = 5.700$ U. Å., c'est-à-dire aux places des deux bandes intermédiaires de la méthémoglobine. Ces bandes étaient-elles le fait de l'oxyhémoglobine non transformée, et le temps de contact du sang avec l'alcool était-il insuffisant ? Cette explication est vraisemblable, puisque le fluor, qui modifie le spectre de la méthémoglobine, n'a aucune action sur celui de l'oxyhémoglobine, ceci étant — comme nous l'avons montré avec le Professeur R. FABRE [41] — la base d'un dosage sensible de la méthémoglobine en présence d'oxyhémoglobine.

2° Procédé de V. BALTHAZARD et P. CONDREA [5]. Ces auteurs obtiennent de la méthémoglobine de la façon suivante : on défibrine du sang de bœuf, en l'agitant énergiquement en présence de billes de verre. dès que le prélèvement est fait, à l'abattoir, et l'on ajoute à ce sang défibriné son volume de glycérine neutre préalablement additionnée d'acide acétique cristallisable en proportion telle que la teneur en acide de l'ensemble soit de 1 p. 100. On porte le mélange à l'étuve à 38° ; on l'y laisse 4 à 5 heures.

Les auteurs ont constaté, en dosant la méthémoglobine par le procédé cyanhymétrique de V. BALTHAZARD et M. PHILIPPE [6], que, dans ces conditions, la méthémoglobini-sation est totale ; de plus, le produit obtenu est stable et se conserve une année au moins sans altération, ce que l'expérience nous a permis de vérifier.

Mise en solution dans l'eau, cette méthémoglobine de V. BALTHAZARD et P. CONDREA [5] montre le spectre d'absorption que nous avons défini ; toutefois, les deux bandes intermédiaires sont difficilement visibles à l'œil, mais en construisant la courbe on retrouve les quatre inflexions caractéristiques. La bande dans le rouge est très belle et, par fluoration, la bande de Menzies aussi est bien délimitée.

C'est cette solution-mère de méthémoglobine que nous avons utilisée exclusivement au cours de nos recherches. Pour l'emploi, on en fait une dilution extemporanée à l'eau distillée. On filtre et l'on utilise aussitôt, car la solution aqueuse s'altère assez rapidement.

Nos essais ont désormais porté seulement sur la région rouge du spectre, où se trouve la bande intéressante de la méthémoglobine et la bande de Menzies apparaissant par fluoration.

Les dilutions de méthémoglobine utilisées comme réactifs furent celles pour lesquelles le maximum d'absorption dans le rouge avait une densité optique comprise entre 1 et 2, correspondant à des angles de 5 à 15°. Hors de ces limites, les mesures sont imprécises ; pour des angles plus petits, en effet, la densité optique varie beaucoup quand

l'angle varie peu, et les lectures étant difficiles, car il y a peu de lumière, sont plus aisément erronées ; si, au contraire, les angles de rotation sont grands, la densité optique ne varie que très peu quand on tourne le nicol mobile d'un arc assez important, et la sensibilité est moindre.

Une solution-réactif convenable est obtenue en mettant, dans 100 cm³ d'eau, 6 à 8 cm³ de méthémoglobine, correspondant à 150-200 gouttes. Bien entendu, on peut augmenter cette concentration, s'il y a peu de fluor à rechercher par exemple, pour que la bande intéressante apparaisse mieux ; mais, en principe, il est préférable d'opérer dans les conditions de dilution que nous venons d'établir.

Ayant préparé une solution titrée de fluor au moyen de fluorure de sodium — sel soluble et facilement obtenu pur — notre premier travail a été d'en prélever des portions aliquotes, de les additionner d'une même quantité de « réactif-méthémoglobine » et de construire les courbes d'absorption des mélanges correspondants. Pour être dans les mêmes conditions de dilution pour la série d'essais, chaque prise était évaporée à sec au bain-marie, sans calciner et, après refroidissement, additionnée d'un même volume de réactif ; après un temps de contact de 10 à 15 minutes pour chacune, on faisait l'essai spectrophotométrique.

Les résultats furent les suivants :

a) *Sur des quantités de fluor supérieures à 1 mg.*

Pour une dose de fluor de 0 g., 01 mise en présence de 10 cm³ de réactif contenant X gouttes de solution-mère de méthémoglobine, la bande de Menzies, très visible directement au spectroscope, présente un maximum entre $\lambda = 6.080$ U.Å et $\lambda = 6.100$ U. Å. A cette longueur d'onde correspond une densité optique de 2,8 donc très grande.

Si, toutes choses égales d'ailleurs, on fait l'essai sur une dose de fluor moitié moindre (5 mg.) on constate que la courbe varie peu et la densité optique à son maximum reste sensiblement la même. Ainsi, pour des quantités de fluor comprises entre 5 et 1 mg., on remarque que le maximum

d'absorption dans le rouge est fixé à $\lambda = 6.100$ U. Å, et que les valeurs des densités optiques de ce maximum sont trop proches les unes des autres pour qu'on puisse reconnaître avec précision des doses de fluor variant du simple au double.

b) Sur des quantités de fluor inférieures à 1 mg.

Au-dessous de 1 mg., il n'en est plus de même, et l'on constate, en diminuant les doses de fluor :

1° Que la place du maximum d'absorption jusqu'alors fixée à $\lambda = 6.100$ U. Å. se déplace vers le rouge à partir de 0 mg., 4 de fluor, jusqu'à se confondre avec la bande de la méthémoglobine elle-même quand les doses de fluor sont devenues infimes (0 mg., 05). Cette confusion constitue évidemment la limite de perceptibilité du fluor.

2° Que les densités optiques, à ces maxima, diminuent assez rapidement quand la teneur en fluor diminue, pour qu'il soit possible de construire des courbes distinctes les unes des autres quand les doses de fluor varient de 0 mg., 2.

Nous avons cherché à serrer le problème, d'abord en augmentant la concentration du réactif utilisé ; mais on est limité — comme nous l'avons montré plus haut — par la visibilité dans l'appareil. On pouvait aussi diminuer la quantité de réactif-méthémoglobine mis en œuvre, pour que la proportion de fluor soit relativement plus grande. La cuve d'observation au spectrophotomètre ayant une contenance de 3 cm³, on a pu diminuer la quantité de réactif jusqu'à cette limite.

Nous avons, d'autre part, constaté que la fluoration de la méthémoglobine était pratiquement instantanée, mais il importe de faire les mesures dans les mêmes conditions de temps pour que n'entrent pas en jeu les pertes par évaporation du réactif — cette considération ayant évidemment d'autant plus d'importance que le volume de celui-ci est plus petit.

Dans les meilleures conditions, nous sommes arrivée à constituer une échelle de courbes comme celle représentée sur la figure ci-contre (fig. 2) :

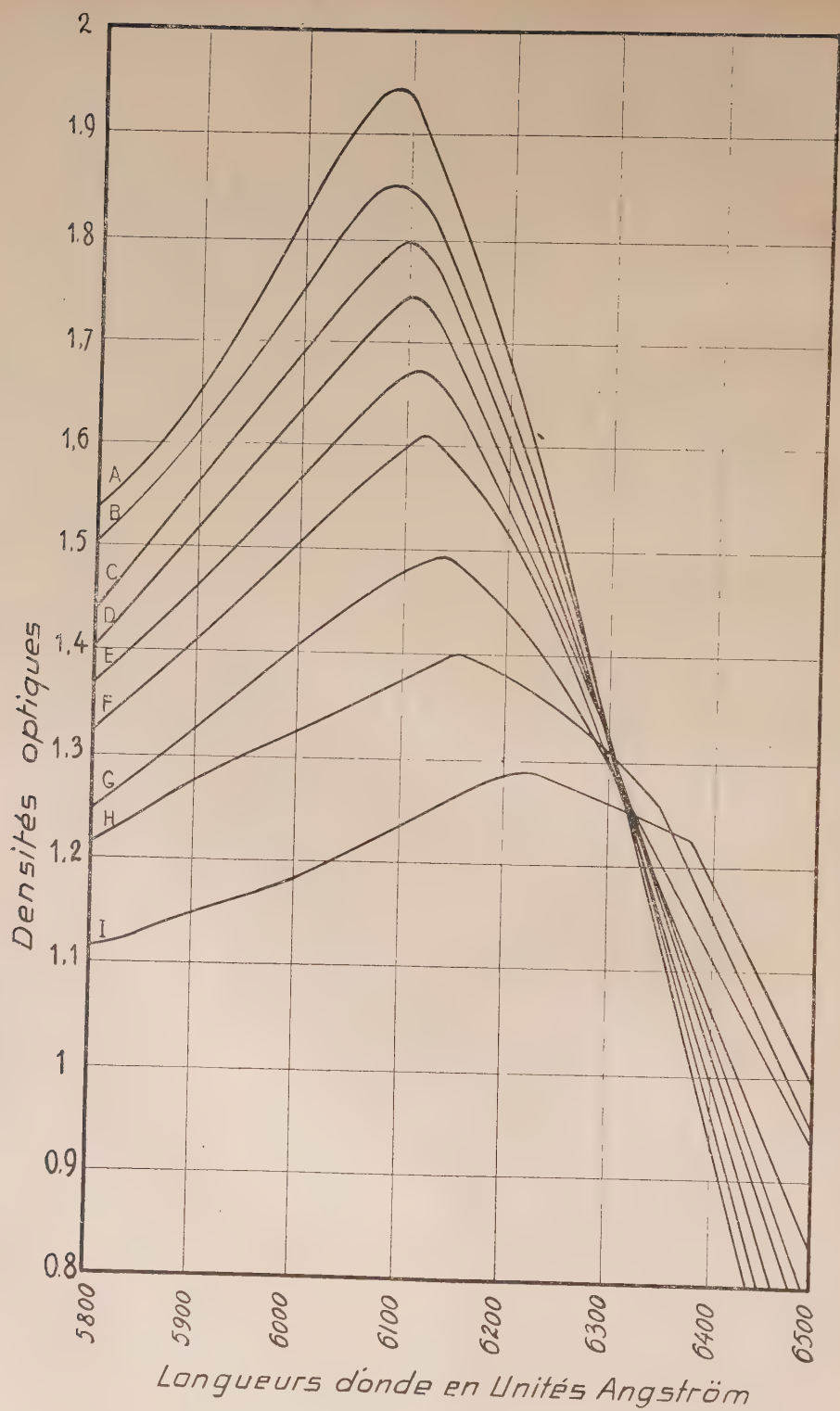


Fig. 2.

Elle montre que des différences de 0 mg., 1 de fluor sont décelables après action de la méthémoglobine, par la variation des densités optiques aux maxima d'absorption et par la place de ces maxima entre $\lambda = 6.100$ et 6.200 U. Å. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous, qui correspond aux courbes de la figure 2 :

SOLUTION-RÉACTIF A 7 cm^3 5 P. 100 DE SOLUTION-MÈRE
(RÉACTIF UTILISÉ PAR 10 cm^3 POUR CHAQUE ESSAI)

CONCENTRATION DE FLUORURE DE SODIUM EN MG.	PLACE DU MAXIMUM D'ABSORPTION EN U.Å.	ANGLE DE ROTATION AU MAXIMUM D'ABSORPTION	DENSITÉ OPTIQUE CORRESPONDANT A CES ANGLES	COURBES
3	6.080	$2^{\circ}34'$	2,7	
2	6.080	$3^{\circ}12'$	2,51	
1	6.080	$6^{\circ}4'$	1,95	A
0,8	6.080	$6^{\circ}47'$	1,86	B
0,7	6.100	$7^{\circ}16'$	1,80	C
0,6	6.100	$7^{\circ}41'$	1,75	D
0,5	6.100	$8^{\circ}15'$	1,68	E
0,4	6.110	$9^{\circ}4'$	1,61	F
0,3	6.130	$10^{\circ}25'$	1,49	G
0,2	6.160	$11^{\circ}26'$	1,41	H
0,1	6.220	$13^{\circ}1'$	1,20	I

En résumé, pour des doses de fluor comprises entre 1 mg., et 0 mg., 1, on doit pouvoir caractériser, avec une précision de 0 mg., 1, le fluor par combinaison avec la méthémoglobine.

Pour des doses inférieures à 0 mg., 1, la caractérisation n'est plus possible ; pour des doses supérieures à 2 mg., elle n'offre aucune précision.

Il fallait ensuite vérifier que le dosage comparatif était possible. Dans ce but, nous avons dosé des solutions de

fluorure de sodium dont le titre était ignoré de nous. Ce titre pouvait avoir toutes les valeurs comprises entre 0 mg., 1 et 10 mg.

Par évaporation de parties aliquotes ou de la totalité de ces solutions, nous nous plaçons dans les conditions optima de l'échelle spectrophotométrique, c'est-à-dire au-dessous du milligramme. Avec un peu de pratique, le changement de coloration du réactif donne déjà un renseignement sur la teneur en fluor du mélange.

Nous avons pu, de la comparaison avec les courbes-témoins, déduire avec une précision convenable la teneur de la solution, comme le montrent quelques-uns des résultats obtenus que nous résumons dans le tableau suivant :

Quantité de fluor, sous forme de fluorure de sodium :

AJOUTÉE (EN MG.)	TROUVÉE (EN MG.)
7,60	8,00
5,00	4,50
3,80	4,00
2,70	2,40
2,55	2,60
2,00	1,95
1,30	1,20
1,15	1,25
0,75	0,75
0,50	0,55
0,40	0,40
0,30	0,25
0,10	0,10
0,05	0,10
0,01	0,05
0,00	0,00

En réalité, la précision est plus grande si l'on construit, au moment de l'essai, les courbes-témoins de façon à utiliser exactement le même réactif et à être absolument dans les mêmes conditions pour l'essai et les témoins, ainsi qu'il

se doit dans une méthode comparative. L'échelle-type sert d'ailleurs à fournir une première approximation, ce qui évite de préparer tous les témoins.

La méthode ayant été reconnue donner des résultats satisfaisants pour des teneurs en fluor de l'ordre de la fraction de mg. (contenues dans un volume quelconque de solution, puisqu'on évapore à sec le liquide neutralisé avant de faire l'essai), nous nous sommes demandée si la présence de substances étrangères dans la solution pouvait avoir une action sur la formation de la méthémoglobine fluorée et sur le dosage.

De premiers essais rapides nous montrèrent que des quantités indéterminées de cendres de viande ajoutées au fluorure empêchaient le spectre de la méthémoglobine fluorée de se développer. Nous avons cherché, par une étude systématique à quelle partie des cendres pouvait être imputable cette action inhibitrice. Dans ce but, nous avons examiné successivement l'action du chlorure de sodium, du carbonate de sodium, du phosphate disodique et du pH sur la fluoration de la méthémoglobine.

1° Action du chlorure de sodium.

Nous avons ajouté progressivement à des quantités définies de fluor (et variant pour les divers essais de 0 mg., 1 à 0 mg., 6), des doses de chlorure de sodium allant de 0 mg., 1 à 100 mg. Les résultats des observations spectrophotométriques furent les suivants :

Le chlorure de sodium ajouté au fluorure modifie l'intensité de la bande de la méthémoglobine fluorée, pour abaisser sa densité optique au maximum d'absorption dès qu'il y a parties égales de ces deux sels. Cette variation est assez peu marquée pour des quantités de chlorure de sodium allant jusqu'à une teneur dix fois plus grande que celle du fluor ; mais à partir de ce moment, si l'on augmente encore la proportion de chlorure, la place du maximum d'absorption passe de $\lambda = 6.100$ U. Å à $\lambda = 6.150$ et même à $\lambda = 6.200$ U. Å, en même temps que

sa valeur devient très différente de celle obtenue dans les mêmes conditions sans chlorure. Ainsi, pour un essai fait sur 0 mg., 5 de fluorure de sodium pur, au maximum d'absorption correspond une densité optique de 1,78.

Cette densité devient :

en présence de	0 mg., 5	de chlorure de sodium	: 1,76
—	1 mg.	—	1,75
—	2 mg., 5	—	1,75
—	5 mg.	—	1,73
—	25 mg.	—	1,58
	(et sa place est $\lambda = 6.180$ U. Å.)		
—	50 mg.	—	1,48
	(et sa place est $\lambda = 6.300$ U. Å.)		

Le chlorure de sodium, à cette forte dose, semble avoir détruit la combinaison méthémoglobine-fluorée et redonné la méthémoglobine acide, dont la densité optique au maximum d'absorption ($\lambda = 6.330$ U. Å.) est, dans les mêmes conditions, de 1,45.

Cet essai confirme l'opinion de E. DERRIEN [37] sur l'action des sels neutres sur la méthémoglobine fluorée.

2° Action du carbonate de sodium.

La variation de la courbe montre, là encore, un abaissement de la densité optique au maximum d'absorption, abaissement qui ne commence à se manifester que lorsque le mélange renferme deux fois plus de carbonate de sodium que de fluorure de sodium. En revanche, dès que la teneur en carbonate est devenue cinq à six fois plus grande que celle en fluorure, l'abaissement est trop important pour qu'une comparaison soit possible avec un témoin dépourvu de carbonate.

3° Action du phosphate disodique.

Ce sel montre, sur la courbe de la méthémoglobine fluorée, la même action que le carbonate de sodium dès que le mélange renferme deux fois plus de phosphate que de

fluorure. Cette action aboutit aussi, quand on augmente la teneur en sel étranger, à un aplanissement de la courbe dans le rouge.

Ces trois sels semblant avoir une action tout à fait parallèle, nous les avons mélangés à parties égales et avons fait une nouvelle série d'essais avec ce mélange. Les résultats ont été analogues. Il semblait donc que la proportion de sels mélangés au fluorure intervenait plus pour altérer la courbe de la méthémoglobine fluorée, que la qualité du sel utilisé. Cette altération se manifestait à la fois par la diminution d'amplitude de l'inflexion due à la bande de Menzies et par l'abaissement de la densité optique à son maximum d'absorption.

4° Action du pH.

a) *Action de l'acide acétique.*

L'acide dilué au centième manifeste peu d'action.

L'acide dilué au dixième a pour effet, dès qu'on en ajoute une goutte à une fraction de milligramme de fluor en présence de 10 cm³ de réactif, de relever le maximum de la courbe pour $\lambda = 6.100 \text{ U. \AA.}$

En milieu très acide (acide non dilué), il y a destruction du pigment et la courbe n'a plus de signification.

b) *Action de l'ammoniaque.*

L'ammoniaque au 1/100 manifeste déjà une action en abaissant le maximum d'absorption ; ceci devient très net dès qu'on utilise une goutte d'ammoniaque au 1/10. Dans ces conditions, la bande intéressante est atténuée et son maximum diminue comme sous l'action des sels. Dès que l'alcalinité augmente (trois gouttes d'ammoniaque au 1/10) il y a aussi destruction du pigment.

En résumé, ces considérations montrent que la courbe de la méthémoglobine fluorée est altérée par des impuretés

salines et détruite dès que le milieu n'est plus neutre, ou très voisin de la neutralité.

Cette condition n'étant pas toujours réalisable, nous avons voulu essayer une autre technique. Parmi les dosages colorimétriques que nous avons cités, deux surtout nous ont semblé intéressants : celui de W.-D. ARMSTRONG [3] et celui qui utilise la réaction de J.-H. DE BOËR [11]. Ces auteurs ont, en effet, dosé le fluor en présence d'autres sels, comme nous allons le voir maintenant.

B. — METHODES COLORIMETRIQUES.

1° METHODE DE W.-D. ARMSTRONG

Nous avons vu que W.-D. ARMSTRONG a mis au point une méthode de dosage du fluor utilisant l'affaiblissement de coloration du dérivé ferrique de l'acétylacétone par action des fluorures. Pour pallier à la présence d'impuretés susceptibles de contribuer à cet affaiblissement, l'auteur compare l'effet produit par une partie aliquote de la solution à celui que produit la même partie aliquote additionnée d'une quantité connue de fluorure.

Le fluor contenu dans la portion aliquote utilisée est obtenu en multipliant par la quantité de fluor ajoutée le rapport des affaiblissements observés avec la quantité inconnue et la quantité connue.

Le mode opératoire de W.-D. ARMSTRONG [3] est le suivant :

A la solution acidifiée ne renfermant pas plus de 0 mg., 25 de fluor, on ajoute 1 cm³ de solution de chlorure ferrique renfermant 0 mg., 3 de fer et 1 cm³ d'une solution aqueuse à 5 p. 1000 d'acétylacétone ; on complète à 25 cm³. On prépare de la même façon un témoin, en ajoutant seulement 0 mg., 1 de fluor en plus, et on fait une série de lectures

colorimétriques en comparant les deux solutions. Les résultats sont donnés par la formule :

$$F = \frac{(x - 20) D \times 0,1}{Y - x}$$

où : F est la quantité de fluor en mg. de la solution totale;

D le rapport du volume total de la solution au volume des parties aliquotes utilisées,

x la moyenne des lectures colorimétriques pour la solution inconnue,

Y la moyenne des lectures colorimétriques pour la solution inconnue additionnée de 0 mg., 1 de fluor.

Nous avons essayé cette méthode dans les conditions que nous venons de définir.

Il nous a été difficile d'obtenir des résultats constants en utilisant le colorimètre de Duboscq, car nous avons remarqué que le dérivé ferrique de l'acétylacétone ne subissait pas réellement un affaiblissement de coloration sous l'influence des fluorures, mais bien plutôt un changement de coloration et, dans ces conditions, l'examen au colorimètre, même en utilisant un verre bleu, est très difficile ; il y a passage du brun-rouge au brun-jaune. Cette considération nous a fait essayer le dosage dans d'autres conditions.

Dans un tube *a* nous mettons 1 cm³ de chlorure ferrique et 1 cm³ d'acétylacétone et nous complétons à 10 cm³ avec de l'eau.

Dans un second tube *b*, de même diamètre, nous mettons les mêmes quantités de réactif et une partie aliquote de la solution de fluorure à titrer et nous complétons à 10 cm³ avec de l'eau distillée.

Au moyen d'une micro-burette, nous versons dans le tube *a* une solution de fluor à 0 mg., 1 par cm³ en quantité suffisante pour obtenir une coloration identique à celle du tube *b*. Comme ceci dilue le réactif, au moyen d'une burette jumelle nous ajoutons en même temps, à *b* un volume d'eau

égal au volume de solution de fluorure ajouté à a . Par ce moyen, nous obtenons deux teintes égales et comparables.

Si x est la quantité de fluor cherchée, en milligrammes,
 y le volume de solution de fluorure ajouté et
 z la quantité de fluor contenue dans le volume y .

on peut écrire le rapport :

$$\frac{x}{z} = \frac{10}{10 + y}$$

$$x = \frac{z \times 10}{10 + y}$$

Dans ces conditions, la méthode nous a donné de bons résultats sur des solutions de fluorure de sodium, comme en témoignent les exemples suivants :

FLUOR PRÉSENT (EN MG.)	FLUOR TROUVÉ (EN MG.)
0,20	0,18
0,15	0,155
0,09	0,08
0,16	0,165
0,07	0,068
0,11	0,11
0,32	0,30
0,11	0,09
0,03	0,03

D'après ARMSTRONG, la présence de 0 g., 05 de chlorure de sodium, ou de 0 g., 10 de sulfate de sodium, ou de ces deux sels à la fois à ces doses limites, est sans influence sur le complexe coloré. De même le nitrate de sodium jusqu'à 0 g., 40, et l'acide silicique jusqu'à saturation n'ont pas d'effet sur la coloration du dérivé ferrique de l'acétyl-acétone.

Nous avons essayé de vérifier ces dires, et trouvé qu'en réalité, à ces fortes doses, la coloration est altérée par les

sels étrangers, et des essais effectués en présence de mélange de sels (phosphate, chlorure et sulfate de sodium; nous ont donné de mauvais résultats pour des doses bien moindres. Ainsi, en ajoutant 15 mg. du mélange de sels précité à 0 mg. 17 de fluor, nous retrouvions 0 mg., 24 de cet élément.

Il est à noter que l'acidité a un rôle prépondérant et fait virer la teinte au jaune, tout comme le fluor.

2° METHODE UTILISANT LA REACTION COLOREE DE J.-H. DE BOER

J.-H. DE BOER [11] a mis en évidence, nous l'avons vu, que l'acide fluorhydrique agissait à des doses beaucoup plus faibles que les autres acides sur le complexe rouge violacé que forme l'alizarine-sulfonate de sodium avec un sel de zirconium, pour former un nouveau complexe jaune, et que le changement de coloration obtenu pouvait servir à un dosage.

Ce fait a été utilisé par R. CHARONNAT et Mlle S. ROCHE [21] pour doser le fluor dans les eaux minérales, c'est-à-dire en présence de quantités non négligeables d'autres ions. Les auteurs ont affirmé que le procédé donnait de bons résultats même dans ce cas.

Nous avons essayé la technique qu'ils ont mise au point :

Dans une série de tubes de NESSLER, ils préparent une gamme dont les différents termes varient de 1/40 de mg., au moyen d'une solution standard de fluorure de sodium. Les tubes renferment ainsi : 0 mg., 025 - 0 mg., 050 - 0 mg., 075 - 0 mg., 10 - 0 mg., 125 - 0 mg., 15 - 0 mg., 175 - 0 mg., 20, etc., jusqu'à 0 mg., 50 de fluor. Ils complètent à un volume de 50 cm³. Dans un tube ils mettent de même 50 cm³ de solution à titrer. Les divers tubes sont additionnés de 20 cm³ d'acide chlorhydrique pur, puis de 5 cm³ d'un réactif contenant, pour 1.000 cm³ d'eau distillée, 0 g., 34 d'alizarine-sulfonate de sodium et 1 g., 74 de nitrate de

zirconyle cristallisé. Les tubes sont agités et laissés au repos 1 heure. La coloration se développe ; on les agite à nouveau et l'on compare le tube contenant la prise d'essai aux tubes de l'échelle.

Après avoir essayé cette technique, nous avons fait les constatations suivantes :

Les tubes variant entre eux de $1/20$ de milligramme — c'est-à-dire 1 tube sur 2 dans l'échelle — offrent une série de colorations ayant une différence marquée d'un terme à l'autre ; mais la différence est moins certaine entre 2 tubes voisins, c'est-à-dire ne différant que de $1/40$ de mg.

De plus, après avoir essayé de varier les proportions des réactifs, nous avons trouvé qu'il était préférable d'utiliser seulement 10 cm^3 d'acide chlorhydrique pour 5 de réactif coloré. Les colorations sont ainsi moins jaunes et, à notre sens, plus faciles à apprécier. De plus, la coloration se développe lentement et il est préférable de faire la comparaison après 2 heures de repos en agitant convenablement le contenu des tubes, qui précipite toujours assez rapidement une partie de son colorant.

La coloration, développée assez vite au début, continue ensuite à évoluer lentement et si l'on conserve l'échelle et qu'on refasse une nouvelle comparaison quelques heures après la première, on constate que les résultats sont les mêmes, bien que la coloration de chaque terme ait évolué vers le jaune. Il n'est donc pas possible de comparer un nouvel essai à une échelle préparée quelques heures auparavant, ou inversement.

Dans les conditions où nous opérons, les colorations sont distinctes, même en couche mince, dans des tubes étroits.

Le réactif coloré s'altère assez rapidement et, si on l'utilise par exemple un mois après sa préparation, il fournit une échelle de colorations moins marquées ; il est donc préférable de ne l'employer que récemment préparé.

La partie intermédiaire de l'échelle — celle comprise entre 0 mg., 15 et 0 mg., 35 — est la plus sensible, c'est-à-dire que les teintes de deux termes voisins sont mieux différenciées qu'aux extrémités.

Résultats obtenus. — Des essais faits sur des solutions de fluorure de sodium pour des teneurs variant de quelques milligrammes à 1/20 de mg. nous donnèrent de bons résultats dans les conditions que nous venons de définir ; pour les solutions riches en fluorure, le dosage est effectué sur une portion aliquote.

EXEMPLES DE RÉSULTATS OBTENUS SUR DES SOLUTIONS DE
FLUORURE DE SODIUM

FLUOR PRÉSENT (en mg.)	PORTION DE SOLUTION UTILISÉE	FLUOR TOTAL TROUVÉ (en mg.)
0	totalité	0
0,25	—	0,25
0,32	—	0,30
0,06	—	0,075
0,18	—	0,15
0,38	—	0,40
0,80	1/3	0,825
2,00	1/5	2,00
3,00	1/10	2,75
5,30	1/20	5,50

Les résultats étant satisfaisants avec des solutions de fluorure de sodium pur, nous avons essayé le dosage sur des solutions renfermant des sels étrangers. Nous avons ajouté au fluorure un mélange de nitrate, sulfate et chlorure de sodium. Nous avons constaté que le dosage était encore possible quand le mélange renferme cent fois plus de sels étrangers que de fluorure. Au delà de cette limite, les résultats sont erronés, et les quantités de fluor trouvées toujours supérieures à celles existant réellement, car les autres acides agissent, à ces fortes doses, comme l'acide fluorhydrique agit en petite quantité.

Nous avons alors pensé associer ce procédé colorimétrique avec la méthode d'isolement par laquelle on entraîne le fluor à l'état d'acide hydrofluosilicique.

Les essais que nous avons faits dans cette voie nous ont permis de constater que le procédé de distillation de H.-H. WILLARD et O.-B. WINTER [107] donnait de bons résultats et que le fluor était séparable d'un mélange de sels même en présence d'un peu de matière organique ajoutée à des doses variant de la fraction de milligramme à quelques milligrammes. Voici quelques-uns de nos essais :

1° A 1 mg. de fluor nous ajoutons 10 mg. de cendres solubles de sérum (composition non définie), nous distillons une première portion de 60 cm³ : nous y décelons selon les essais, 0 mg., 97 ou 1 mg., 07 de fluor, ce qui, en moyenne, correspond à peu près au milligramme existant. Deux portions successives de 50 cm³ ne renferment pas de fluor, ce qui démontre que la totalité se trouvait dans les 60 premiers cm³.

2° A 1 mg. de fluor nous ajoutons 15 mg. de cendres solubles de sérum.

Une première portion distillée de 50 cm³, renferme 0 mg., 95 de fluor (moyenne de 2 dosages portant sur 1/4 et 1/8 du distillat). Une seconde portion de 25 cm³ ne renferme pas de fluor.

3° 0 mg., 60 de fluor sont additionnés de 20 mg. de sels variés, de 2 mg. d'urée et de 2 mg. de glucose.

Nous distillons par portions fractionnées : une première portion, de 60 cm³, renferme 0 mg., 50 de fluor une seconde portion, de 25 cm³, en contient 0 mg., 05, une troisième portion, de 25 cm³ ne renferme pas de fluor.

4° 0 mg., 45 de fluor sont mélangés à des sels variés. On retrouve 0 mg., 40 de fluor dans les 50 premiers cm³ (dosage portant sur la moitié du distillat).

5° 1 mg., 20 de fluor sont additionnés de 0 g., 03 de sels étrangers. On retrouve à la distillation dans les 75 premiers cm³ : 1 mg., 12 de fluor (dosage portant sur 1/10 du distillat).

Ces exemples montrent que l'isolement du fluor des autres sels est praticable par la méthode de H.-H. WILLARD et O.-B. WINTER [107], et que le dosage colorimétrique basé sur la réaction de J.-H. DE BOËR [11] est possible dans le distillat.

En résumé. — Après avoir étudié diverses micro-méthodes de dosage du fluor, nous avons mis au point une méthode spectrophotométrique qui nous a donné de bons résultats sur des solutions de fluorure dépourvues de sels étrangers mais s'est révélée inapplicable dans les autres cas.

Nous avons alors essayé la méthode colorimétrique de W.-D. ARMSTRONG [3] qui, pratiquée comme nous l'avons dit, nous a donné aussi de bons résultats, mais qui, contrairement à l'opinion de son auteur, devient inconstante en présence d'autres acides et, en particulier, en milieu chlorhydrique.

La méthode utilisant le nitrate de zirconium et l'alizarine-sulfonate de sodium permet le dosage convenable du fluor, même en milieu chlorhydrique ; ceci nous a conduit à l'associer avec l'entraînement du fluor à l'état d'acide hydrofluosilicique par le procédé de H.-H. WILLARD et O.-B. WINTER [107]. Nous verrons que dans les conditions où ils opèrent, les auteurs volatilisent la totalité du fluor, mais en même temps un peu d'acide chlorhydrique passe à la distillation. Cet acide ne gêne pas le dosage colorimétrique que nous avons pratiqué par la technique, légèrement modifiée, de R. CHARONNAT et de Mlle S. ROCHE [21].

CHAPITRE IV

MODES D'ELIMINATION DE LA MATIERE ORGANIQUE

Après nous être assurée que le micro-dosage du fluor restait possible en présence de faibles quantités d'ions étrangers, il était nécessaire, pour être dans ces conditions d'éliminer la majeure partie des autres éléments du mélange où se trouve contenu le fluor et surtout la matière organique.

En effet, le toxicologue utilise, comme matériaux de travail, des organes ou des liquides biologiques : l'élément à rechercher et à doser est donc dispersé dans un volume abondant de substances étrangères que, généralement, l'on minéralise par destruction.

Nous avons pensé que le fluor, constitué par une molécule très petite — puisque son poids moléculaire est 19 — était susceptible d'être isolé par une technique physique, au moyen de laquelle nous séparerions simplement la matière organique au lieu de la détruire.

Les moyens physiques utilisables pour cette séparation des sels minéraux et des matières albuminoïdes colloïdales sont l'ultrafiltration, la dialyse, l'électrodialyse.

Nous avons étudié le premier et le troisième procédés : la dialyse est toujours une opération très lente et nous, l'avons délaissée au profit de l'électrodialyse.

I

Destruction

On utilisait autrefois la simple incinération des matières organiques pour les détruire. On a reconnu que, dans ce cas, la destruction était incomplète, et de nombreux auteurs ont préconisé, pour la parfaire, l'emploi de mélanges oxydants, acides ou alcalins, selon les caractères de l'élément à isoler.

Parmi les techniques déjà utilisées dans le cas du fluor, on peut citer : la destruction en milieu alcalin et la destruction en milieu acide.

A. — DESTRUCTION EN MILIEU ALCALIN.

Pour le fluor, il semblerait que la destruction en milieu alcalin — au cours de laquelle cet élément passerait à l'état de fluorure ou de fluosilicate alcalin stable — soit à préférer. C'est le procédé qu'employa A. GAUTIER [48] dans les dosages du fluor normal des organes et tissus animaux, pour lesquels il mit au point la technique dont nous avons parlé (voir page 44). Il incinéra, en capsule de platine,

les tissus préalablement desséchés et mélangés avec 2 p. 100 de chaux vive.

Mme H. DIDIER [39] a fait de ce procédé les critiques suivantes :

D'abord, la dessiccation des tissus est une opération longue ; le résidu est difficile à pulvériser et, de ce fait, le mélange à la chaux n'est pas facile à obtenir ; de plus — et c'est là un grief assez important — la calcination en milieu alcalin aboutit à la fusion du platine, ce qui boursouffle et perce rapidement les capsules utilisées.

B. — DESTRUCTION EN MILIEU ACIDE.

Pour ces raisons, Mme H. DIDIER [39] préfère détruire la matière organique en milieu oxydant acide, et donne deux procédés de valeur identique ; le deuxième, étant plus simple lui paraît préférable :

a) Les viscères sont laissés 24 heures, à froid, en contact avec l'acide azotique ; ce mélange est agité souvent puis on ajoute quelques centimètres cubes d'acide sulfurique et l'on chauffe dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux.

Le mélange est jeté dans une capsule refroidie pour obtenir la séparation du gâteau des graisses. Le liquide de destruction remis dans le ballon est additionné de soude, puis d'acide chlorhydrique pour neutraliser. et, peu à peu, de chlorate de potassium.

On continue à chauffer au réfrigérant ascendant et la destruction est terminée quand le liquide est devenu jaune clair.

b) Les viscères sont simplement mis en contact, pendant 7 à 8 heures, avec de l'acide azotique. On chauffe doucement, et ceci suffit à solubiliser la matière organique. On additionne alors d'ammoniaque jusqu'à neutralisation.

Dans les deux cas, le liquide neutralisé est précipité au moyen d'une solution de chlorure de baryum à 10 p. 100 et de sulfate de sodium. On laisse le réactif en contact

quelques heures à froid, puis on porte à l'ébullition quelques minutes et l'on filtre ; le précipité et le filtre sont calcinés en capsule de platine jusqu'à obtention de cendres blanches, qui contiennent tout le fluor.

Mme H. DIDIER [39] affirme que, dans ces conditions, il n'y a que des « pertes minimales », sans d'ailleurs faire connaître le procédé de dosage qu'elle a utilisé pour cette évaluation.

II

Ultrafiltration

La technique que nous avons choisie est celle indiquée par P. GRABAR, en 1930 [54].

Nous voulons ici remercier Mlle Jeanne LÉVY, qui nous a réservé un bienveillant accueil à son laboratoire de l'Hôpital Cochin, où l'une de ses collaboratrices nous a permis de nous initier rapidement à la technique d'ultrafiltration que nous avons utilisée par la suite.

L'opération est, comme son nom l'indique, une filtration, mais opérée à travers une membrane dont les pores sont extrêmement petits.

Si l'on met un liquide en contact avec une membrane poreuse, les éléments dont le diamètre est inférieur à celui des pores de cette membrane la traversent, tandis que les éléments de diamètre supérieur sont retenus. Cependant, des phénomènes divers, dont le rôle n'est pas négligeable, peuvent intervenir pour modifier, ou même empêcher, cette ultrafiltration ; tels sont par exemple : l'adsorption, la capillarité, la charge électrique, le colmatage.

L'ultrafiltration, à l'origine, a été employée en bactériologie pour séparer certaines bactéries ou virus de leur bouillon de culture, ou pour faire des stérilisations.

A. — APPAREIL ET METHODE UTILISES

L'appareil que nous avons utilisé est constitué par un manchon cylindrique M en verre épais, terminé à sa partie inférieure rétrécie par un cône, dont la surface intérieure est rodée ; ce rodage correspond avec le rodage extérieur d'un tube S fermé à son extrémité supérieure. Ce tube, perforé, servira de support à une bougie filtrante. Le liquide à ultrafiltrer est placé dans le manchon M. La filtration se fait donc de l'extérieur vers l'intérieur de S, rétréci à sa partie inférieure d'où s'écoule le liquide filtré (fig. 3).

La bougie est constituée par une membrane en collodion, fabriquée extemporanément par le dépôt de couches successives de collodion préparé de la façon suivante :

On évapore à sec, dans une capsule de large surface, du collodion ordinaire en solution éthérée. Avec le produit sec, découpé en petits morceaux, on fait une solution à 10 p. 100 en poids dans l'acide acétique cristallisable. Pour cela, on maintient le mélange en contact au bain-marie pendant une ou deux heures ; comme il y a évaporation on complète ensuite avec de l'acide acétique, de façon à réaliser la teneur voulue. On obtient une solution limpide, couleur ambre clair, qui se conserve correctement quelques mois.

Pour faire les bougies, on recouvre le support de verre d'un manchon cylindrique en papier-filtre, fermé à une extrémité et dont le diamètre est tel qu'il adhère exactement au support. On trouve ces manchons de papier dans le commerce.

On plonge cet ensemble quelques secondes dans la solution de collodion, on l'en retire et l'on tourne la bougie aussi régulièrement que possible autour de son axe, en la maintenant horizontale de façon à obtenir une couche uniforme de collodion. L'acide acétique s'évapore et, au bout de 6 à 8 minutes, cette première couche est assez sèche pour qu'on en dépose une seconde par-dessus, en opérant de la même façon. Après séchage de la seconde couche, on en

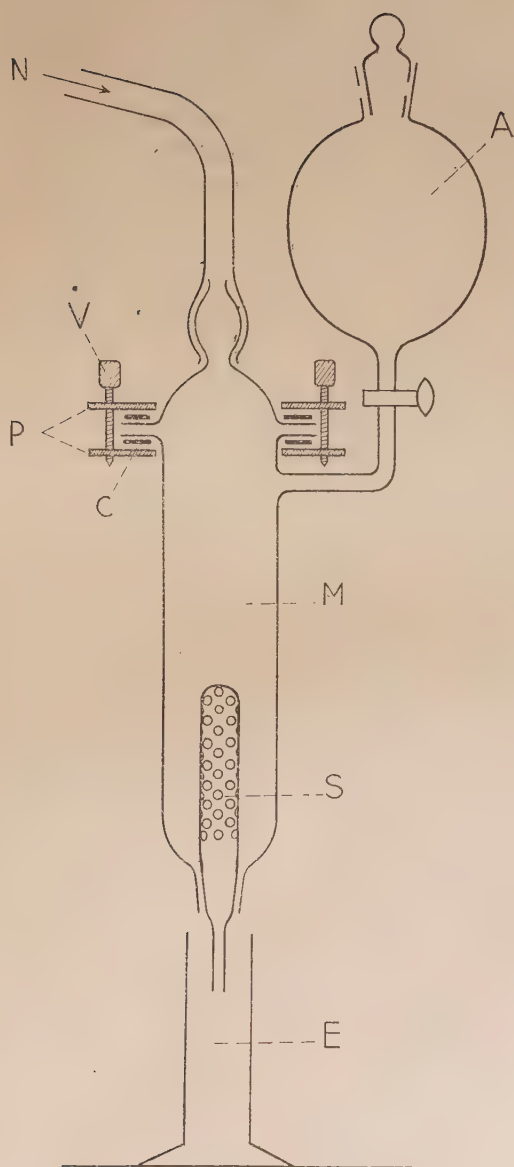


Fig. 3. — Appareil à ultrafiltration.

- M : Manchon renfermant le liquide à ultrafiltrer.
S : Support, percé de trous, de la bougie.
A : Ampoule de réserve.
E : Eprouvette servant à recueillir l'ultrafiltrat.
P : Plaquettes nickelées.
C : Caoutchoucs.
V : Vis de serrage.
N : Arrivée de l'azote sous pression.

fait une troisième ; enfin, une quatrième couche n'est pas séchée, mais aussitôt qu'elle est répartie uniformément, on plonge la bougie avec précaution dans un récipient contenant de l'eau bi-distillée. Il y a coagulation du collodion, et la bougie, jusqu'ici transparente, devient peu à peu blanche et opaque.

La préparation d'une telle bougie demande entre 20 et 25 minutes.

On la conserve dans l'eau bi-distillée, en changeant l'eau plusieurs fois par jour, pendant 24 à 48 heures, de façon à éliminer la majeure partie de l'acide acétique qui imprègne le collodion. Il est préférable d'utiliser les bougies dans les huit jours qui suivent leur préparation ; après ce délai, elles peuvent s'altérer.

Nous avons pratiqué l'ultrafiltration sous pression d'azote. Le liquide biologique est ainsi à l'abri de l'air pendant le temps, assez long, que dure la filtration, bien que celle-ci soit accélérée par une pression supérieure à la pression atmosphérique — généralement 1,5 à 2 atmosphères.

Pour obtenir cette pression, le manchon M est recouvert, à sa partie supérieure, d'un couvercle terminé par une olive à laquelle on adapte un tube de caoutchouc, en relation avec un cylindre d'azote comprimé, pourvu d'un manomètre et d'un robinet à pointeau, permettant le réglage du débit et de la pression de l'azote envoyé. Le couvercle s'adapte exactement sur le bord supérieur du manchon, par un rodage, et est maintenu en place par deux plaquettes métalliques P, reliées l'une à l'autre par des vis V, dont le serrage est maintenu souple, mais hermétique, grâce à des rondelles de caoutchouc C (fig. 3).

Le liquide biologique à ultrafiltrer est donc dans une enceinte parfaitement close et se trouve en milieu inerte dès que l'azote a chassé l'air existant.

Pour éviter les ouvertures fréquentes de l'appareil — dans le cas où l'on aurait à traiter un volume assez grand de liquide — le manchon porte, à sa partie supérieure, un tube latéral relié à une ampoule A, de capacité deux à trois

fois supérieure à celle de M, et qui permet le remplissage rapide de celui-ci. Il suffit d'arrêter le passage de l'azote et de tourner le bouchon de A, muni d'un dispositif spécial, pour revenir à la pression ordinaire et permettre au liquide de l'ampoule de passer en M.

On doit remplir à nouveau le manchon dès que le niveau du liquide affleure la partie supérieure de la bougie, de façon que celle-ci ne soit jamais en contact direct avec l'azote ; il y a donc, toujours un résidu correspondant au volume du liquide qui entoure la bougie à la fin de l'opération, d'où l'intérêt de faire des appareils assez étroits pour que ce volume soit le plus petit possible.

De même cette considération limite la longueur des bougies utilisées — longueur qui aurait, d'autre part, intérêt à être augmentée pour que, la surface filtrante étant plus grande, l'opération se fasse plus vite.

Nous avons utilisé des appareils de 20 à 25 cm³ de capacité, avec des bougies de 1 cm. de diamètre sur 3 à 4 cm. de longueur, dont la surface filtrante effective est celle des trous du support. Pour qu'il n'y ait pas de fuite d'azote, il importe que le robinet rodé mettant en relation l'ampoule de réserve A avec l'appareil M soit enduit d'un lubrifiant très adhésif, et il est bon de laisser du liquide dans le petit tube qui relie le robinet à l'appareil, de façon à constituer un joint hydraulique.

La bougie qui a été conservée dans l'eau bi-distillée est installée dans l'appareil, en la laissant hors de l'eau le moins possible et en évitant de toucher avec les doigts la partie enduite de collodion. On emplit l'appareil d'eau bi-distillée et l'on met en communication avec l'azote ; en effet, même après de nombreux lavages, la bougie conserve toujours de l'acidité, que l'on ne peut éliminer que sous pression. Les premières gouttes qui passent sont très acides au tournesol ; on lave la bougie jusqu'à ce que l'eau de lavage soit devenue neutre. A ce moment, il faut essayer la bougie pour s'assurer qu'elle n'a pas d'imperfection ou de solution de continuité.

Le test consiste à ultrafiltrer une solution colloïdale colorée et à constater que le liquide passé incolore. Le diamètre des micelles de la solution d'essai constituera la limite de passage, à travers la membrane, des éléments à filtrer.

Nous avons employé une solution d'hémoglobine faite extemporanément, à 5 p. 100, à partir d'hémoglobine en paillettes. Cette solution brune est mise dans le manchon, et l'on attend que 3 à 4 cm³ aient ultrafiltré en un liquide incolore pour conclure à la bonne qualité de la bougie, car celle-ci retient toujours quelques centimètres cubes d'eau, qu'il est nécessaire d'éliminer au préalable, pour se rendre compte du passage de la solution d'essai.

Le diamètre des micelles de la solution d'hémoglobine est de l'ordre de 10 m μ . Cette dimension constitue le seuil de ce qui sera retenu par l'ultrafiltre. La bougie, reconnue utilisable est retirée de l'appareil, lavée deux ou trois fois à l'eau bi-distillée pour éliminer l'hémoglobine, qui lui a communiqué une légère teinte jaune ; elle est désormais prête à servir.

B. — ESSAIS.

Nos premiers essais ont consisté à ultrafiltrer une solution aqueuse de fluorure de sodium et à titrer, par la méthode spectrophotométrique, des portions aliquotes d'ultrafiltrat.

Nous avons remarqué que les premiers centimètres cubes recueillis renfermaient toujours moins de fluorure que les suivants ; ceci s'explique, et se justifie, par l'eau toujours retenue dans la membrane filtrante, qui s'élimine au début de l'opération et dilue les premières portions recueillies.

Des prélèvements faits ensuite, sur différentes parties, nous montrèrent que le fluorure ultrafiltre de façon uniforme en milieu aqueux et que, dans ce cas, le dosage est possible sur une portion aliquote.

Nous avons ensuite essayé de voir comment se comportait le fluorure de sodium ajouté à un milieu biologique.

Nous avons choisi le sérum sanguin (sous forme de sérums médicamenteux périmés qu'il est facile de se procurer).

Au cours de nombreux essais effectués, nous avons fait les observations suivantes :

Les sels autres que le fluorure, qui ultrafiltrent en même temps que lui, ont une action marquée sur le dosage spectrophotométrique.

Nous avons étudié précédemment l'action de quelques sels sur la formation de la méthémoglobine fluorée, et constaté qu'ils modifiaient sa courbe d'absorption, en diminuant les densités optiques des maxima. Nous avons pensé, cependant, pouvoir utiliser la méthode spectrophotométrique pour le dosage du fluorure dans les ultrafiltrats, en construisant des courbes d'absorption qui auraient correspondu au fluor mélangé à des proportions diverses d'ions étrangers. Dans ce but, nous avons préparé une solution des divers sels du sérum sanguin aux teneurs où ils existent dans ce milieu, et essayé de construire une échelle dont chaque terme était constitué de quantités croissantes de fluor additionnées d'une même quantité de la solution saline. Cette quantité correspondait au poids moyen de résidu sec d'un volume déterminé d'ultrafiltrat.

Nous avons obtenu une échelle de courbes convenable jusqu'à un taux minimum de fluorure de sodium de 0 mg., 2 ; mais la comparaison ultérieure avec divers ultrafiltrats fut impossible, les courbes obtenues ne correspondant en aucun cas. Sans doute la composition présumée de l'ultrafiltrat était-elle entachée d'erreur quant aux teneurs des éléments qu'elle contenait ; de plus, dans les conditions où nous avons opéré, il passait toujours un peu de matière organique dans le filtrat, et celle-ci participait aussi à la modification des courbes.

Pour nous placer dans des conditions équivalentes, nous avons alors constitué des témoins en ajoutant, à des quantités croissantes de fluorure de sodium, un même volume d'ultrafiltrat de sérum non fluoré. La comparaison, de cette manière, a été possible, mais non sensible. Il faut avoir dans le milieu une quantité de fluor assez grande pour pou-

voir la retrouver directement au spectrophotomètre en présence des autres sels. Si la teneur en fluor est élevée, en effet, on peut faire le dosage sur une petite portion aliquote; où il y a relativement peu de substances étrangères gênantes. D'autre part, en opérant sur une faible quantité, il y a plus de chance de multiplier les erreurs.

La présence des sels étrangers était donc pour nous un obstacle à l'utilisation de l'ultrafiltration comme mode d'élimination de la matière organique.

Mais nous avons remarqué, en outre, que, pour des milieux complexes, le dosage fait sur des parties aliquotes prélevées à divers moments de l'ultrafiltration ne donnait pas toujours un résultat identique; ceci peut être dû au colmatage progressif de la membrane filtrante, qui modifie, à la longue, sa perméabilité. Enfin, on admet que les bougies filtrantes utilisées sont semblables; or, du fait de leur préparation, elles ne le sont pas forcément. En effet, W.-J. ELFORD [40] a publié récemment un travail très intéressant et documenté sur l'obtention de membranes filtrantes de perméabilités déterminées comprises entre 3 $m\mu$ et 10 $m\mu$. Cet auteur a montré que la quantité de collodion utilisée, sa composition, le temps de séchage, la température extérieure, avaient une influence sur la texture de la membrane obtenue, et donc sur sa perméabilité, et qu'il était impossible de faire des membranes cylindriques définies. Nous avons exposé la façon de préparer les bougies que nous utilisions; les conditions opératoires sont forcément assez peu définies.

P. GRABAR [56] a vérifié les essais de W.-J. ELFORD [40], et a construit un nouvel appareil pour membrane plane, de perméabilité déterminée, et l'auteur a pu obtenir, grâce à cette nouvelle technique, un véritable fractionnement dans l'ultrafiltration [55].

Nous avons cherché s'il était possible de retrouver la totalité du fluorure ajouté à un milieu complexe. Pour cela, nous avons ajouté au sérum une grande quantité de fluor (quelques centigrammes) et recueilli la totalité de l'ultrafiltrat. Cette opération est longue, et nous avons dû laisser

l'appareil sous pression d'azote quelquefois deux jours. A la fin, la filtration est très ralentie et, au bout de ce temps, le passage est pratiquement nul.

Pour quelques-uns de ces essais, nous avons additionné d'eau le résidu de l'ultrafiltration pour tenter d'entraîner le reste du fluor.

Le dosage fait sur une portion aliquote de l'ensemble ne nous a jamais permis de retrouver 100 p. 100 de fluor. Les résultats de divers essais ont donné des chiffres variant entre 80 et 90 p. 100.

Bien entendu, si, dans les mêmes conditions, on essayait de doser quelques milligrammes, ou moins, de fluor dans la totalité de l'ultrafiltrat, l'action inhibitrice des substances étrangères était trop manifeste, et l'on ne décelait même pas le fluor.

Si nous avons vu que le dosage sur une portion aliquote, comparativement à des solutions salines identiques, donnait des résultats presque satisfaisants, le procédé n'est évidemment pas généralisable. Nous l'avons vérifié en ultrafiltrant une bouillie de viande ou du lait. Dans des cas aussi différents, la comparaison spectrophotométrique n'était absolument pas possible avec les témoins obtenus au moyen de l'ultrafiltrat de sérum.

Etant donné l'imprécision de l'ultrafiltration telle que nous l'avons pratiquée — c'est-à-dire selon la première technique de P. GRABAR [54] — nous avons abandonné ce procédé, qui ne nous permettait pas d'isoler en totalité le fluor d'un mélange organique.

III

Electrodialyse

Les essais que nous avons exposés, visant à séparer le fluor des milieux biologiques par ultrafiltration, ne nous ayant pas donné les résultats que nous souhaitions, notre Maître, le Professeur René FABRE, nous a encouragée à essayer un autre procédé physique d'isolement : l'électrodialyse.

Cette technique a été employée pour la première fois par H.-W. MORSE et G.-W. PIERCE [71]; puis J. TRIBOT et H. CHRÉTIEN [96] l'ont utilisée pour préparer un hydrate de fer colloïdal.

Depuis une dizaine d'années, quelques auteurs — surtout Ch. DHÉRE [38] et ses collaborateurs (en particulier GORGOLEWSKI) — l'ont appliquée à la biochimie.

A.-W. THOMAS et H.-A. MURRAY [91], dans une étude physico-chimique de la gomme arabique, préconisent l'électrodialyse pour obtenir de l'arabine pure.

Enfin, L. AMY [2] a mis au point une technique qui lui a permis de séparer parfaitement l'arabine des sels minéraux qui y sont liés dans la gomme arabique.

En biologie, S.-E. SÉVERIN [85] cite un procédé de séparation des bases : carnosine, créatine, créatinine en solu-

tion aqueuse, par électrodialyse. N.-P. MESCHKOWA et S.-E. SÉVERIN [85] dosent de la même façon les bases totales du sérum et des globules rouges.

L'électrodialyse ne semble pas avoir encore été appliquée à la toxicologie. A ce point de vue, la question est actuellement à l'étude au Laboratoire de Toxicologie de la Faculté de Pharmacie de Paris, par J. TABONE, à qui nous devons notre apprentissage de la méthode que nous avons utilisée. Nous voulons ici le remercier de l'amabilité dont il a fait preuve à notre égard et des conseils qu'il nous a donnés.

A. — APPAREIL ET METHODE EMPLOYES.

L'électrodialyse consiste à réaliser, au moyen de membranes semi-perméables et du courant électrique, à la fois une dialyse et une électrolyse, donc double effet :

1° Séparation des cristalloïdes — sels minéraux à petites molécules — susceptibles de traverser les membranes, d'avec les colloïdes que constituent les produits organiques, ceux-ci ne les traversant pas.

2° Séparation, parmi les cristalloïdes, des anions et des cations, grâce au courant électrique.

On effectue l'électrodialyse dans une enceinte communiquant par deux membranes semi-perméables avec deux espaces contenant de l'eau distillée où plongent, dans l'un l'anode, dans l'autre la cathode. Si la mixture à traiter est assez riche en sels, donc suffisamment conductrice, le courant passe de l'anode à la cathode. La matière organique reste à l'intérieur, entre les deux membranes, les anions — métaux : Na^+ , K^+ , Fe^{+++} ... — se dirigent vers la cathode, et les cations — métalloïdes : Cl^- , F^- ... — vers l'anode. Les deux électrodes sont en platine et les ions restent en solution aqueuse près de l'électrode correspondante.

Le temps nécessaire, les conditions de pH, de température, d'intensité de courant et de voltage, etc..., varieront évidemment avec la nature de chaque élément.

Le fluor, qui est constitué par une très petite molécule, puisque son poids moléculaire est de 19, et qui est assez fortement ionisé, devait — semble-t-il — traverser facilement les membranes et se rendre à l'anode rapidement.

Notre travail consista, en premier lieu, à nous assurer du passage du fluor, ensuite à rechercher s'il passait en totalité et, dans ce cas, quelles étaient les conditions optima à observer.

Nous avons construit un appareil semblable à celui qu'utilisait J. TABONE. Il est constitué par un cristalliseur et par deux manchons de verre concentriques, à la partie inférieure desquels on peut fixer une membrane. L'espace compris entre les deux manchons — donc entre les deux membranes — reçoit la solution ou le mélange à électrodialyser. Le cristalliseur et le manchon le plus étroit reçoivent de l'eau distillée et chacun une électrode de platine. Sur le trajet du courant, on place un milliampermètre qui permet de contrôler l'intensité du courant pendant l'électrodialyse. Enfin, dans le cristalliseur, on met un thermomètre pour suivre l'évolution de la température au cours des essais.

B. — ESSAIS.

Nos premiers essais portèrent sur des solutions aqueuses de fluorure de sodium pur. Nous fîmes varier successivement :

- La durée de passage du courant.
- Le pH du milieu.
- Enfin, le milieu lui-même par l'adjonction de sels étrangers.

Tous les essais furent faits avec du courant alternatif redressé sous une tension de 120 volts.

Le dosage du fluor dans les liqueurs anodiques et dans la solution restant après l'opération fut fait — rapidement, et directement puisque le fluor était seul en solution — par

la technique colorimétrique à l'alizarine-sulfonate de sodium et nitrate de zirconium, que nous avons essayée précédemment (voir page 65).

1° VARIATION DE LA DUREE DE PASSAGE DU COURANT

α. — Durée : 2 heures.

Nous avons effectué l'électrodialyse d'une solution aqueuse de fluorure de sodium. Le volume de la solution était d'environ 50 cm³, renfermant 1 mg. de fluor.

Autour de l'anode, nous avons placé 50 cm³ d'eau distillée et, autour de la cathode, environ 150 cm³.

La durée de passage du courant fut de 2 heures.

La température, de 20° à l'origine, monta à 32° au bout de la première heure et à 39° au bout de la seconde.

L'intensité du courant était très faible et le milliampère-mètre accusa seulement quelques milliampères, ce qui s'explique par la grande résistance de la solution, constituée par de l'eau presque pure.

Le dosage du fluor dans la liqueur anodique indiqua une teneur totale de 0 mg., 85.

Dans l'espace intermédiaire, nous avons retrouvé 0 mg., 15 de fluor.

Il n'y avait donc pas de pertes et, en deux heures, 85 p. 100 du fluor avaient électrodialysé dans les conditions que nous venons de définir.

β. — Durée : 3 heures.

Un second essai fut fait dans les mêmes conditions, en augmentant la durée de passage du courant jusqu'à 3 heures.

La température ne dépasse pas 35-38° au cours de l'opération, et l'intensité du courant est toujours de quelques milliampères.

Le dosage du fluor dans la liqueur anodique en décela 95 p. 100. Nous nous sommes assurée que, dans l'espace intermédiaire, il restait 5 p. 100 de fluor.

7. — *Durée : 4 heures.*

Un troisième essai fait dans les mêmes conditions sur 1 mg. de fluor (à l'état de fluorure de sodium) contenu dans 50 cm³ d'eau distillée, mais en portant la durée de passage du courant à 4 heures, nous montra que, au bout de ce temps, il reste encore 2 p. 100 de fluor qui n'a pas électrolysé ; à l'anode, on retrouve sensiblement 98 p. 100 du fluor mis en œuvre.

8. — *Durée : 5 heures.*

Enfin, si nous augmentons encore la durée de passage du courant, en 5 heures — dans des conditions par ailleurs identiques à celles des premiers essais — nous retrouvons la totalité du fluor à l'anode, tandis que, dans la liqueur restant entre les deux membranes, après ce temps, le dosage ne décèle pas de fluor.

ε. — *Fractionnement du temps.*

Un nouvel essai porta sur une solution de 1 mg. de fluor (à l'état de fluorure de sodium) contenu dans 50 cm³ d'eau distillée. A l'anode, nous avons placé seulement 30 cm³ d'eau, et à la cathode environ 150 cm³. La durée de passage du courant fut de 1 heure ; au bout de ce temps, nous avons prélevé la liqueur anodique et l'avons remplacée par 30 cm³ d'eau distillée. Nous avons répété l'opération après la seconde heure. Dans ces conditions, nous opérions un véritable fractionnement et le dosage du fluor dans les trois portions prélevées et dans la liqueur restante nous donna les résultats suivants :

— Pendant la première heure : la température monta de 20 à 28°, et le dosage permit de retrouver 68 p. 100 de fluor.

— Pendant la deuxième heure : la température monta à 30° et on retrouva à l'anode 23 p. 100 de fluor.

— Pendant la troisième heure : la température redescendit à 28°, et le dosage décela 8 p. 100 de fluor.

La liqueur restant dans l'espace intermédiaire renfermait encore 0,5 p. 100 de fluor.

Au bout de 3 heures d'électrodialyse, nous avons donc retrouvé — grâce au renouvellement de l'eau à l'anode — 99 p. 100 du fluor mis en œuvre, soit le même résultat que pour une durée de 5 heures sans changement d'eau, toutes choses égales d'ailleurs.

De plus, en renouvelant l'eau, on évite l'élévation de la température. Ainsi, dans l'essai ϵ , la température moyenne a été d'une dizaine de degrés inférieure à celle constatée dans les premiers essais.

Nous nous sommes assurée que, pour une température inférieure à 40°, il n'y a pas de fluor de perdu ; mais, à cette température, il y a déjà évaporation notable de l'eau de la solution, ce qui peut entraîner l'arrêt de l'expérience, d'où l'intérêt d'opérer à une température relativement basse.

Ayant obtenu des résultats satisfaisants sur des solutions de fluorure pur en milieu neutre, nous avons continué nos essais en faisant varier le pH du milieu.

2° VARIATION DU pH DU MILIEU

α . — *Milieu alcalin.*

Nous avons électrodialysé, pendant 2 heures, une solution aqueuse de 1 mg. de fluor (fluorure de sodium), renfermant X gouttes d'ammoniaque pure. Le volume de la solution était de 40 cm³.

A l'anode, où nous avons placé 50 cm³ d'eau, le dosage nous a permis de retrouver 98 p. 100 du fluor, tandis que, dans le liquide à dialyser, il en restait environ 1 p. 100. La température au cours de l'essai, ne dépassa pas 34°.

β . — *Milieu acide.*

L'électrodialyse de 1 mg. de fluor (à l'état de fluorure de sodium) en solution aqueuse additionnée de 1 cm³ d'acide

acétique, dans les mêmes conditions de temps — 2 heures — que l'essai en milieu alcalin, nous amena à constater que l'intensité du courant fut un peu supérieure — 30 à 40 milliampères — à celle des essais en milieu neutre ou ammoniacal.

La température, au cours de cet essai, ne dépassa pas 32°.

A l'anode, nous avons retrouvé 63 p. 100 du fluor mis en œuvre ; le dosage dans le liquide restant entre les membranes après l'opération, ne décèla que 18 p. 100 de fluor. Il y avait donc eu environ 20 p. 100 de pertes.

Ces essais montrent que, pour le fluor, l'électrodialyse pratiquée en milieu alcalin est préférable à celle en milieu neutre, et celle-ci est meilleure que celle en milieu acide puisque, toutes conditions égales d'ailleurs, les pourcentages de fluor ayant électrodialysé en milieux alcalin, neutre et acide sont respectivement, en 2 heures, de 98, 85 et 63 p. 100.

Pour nous rapprocher des conditions qui sont celles des milieux biologiques, nous avons fait une série d'essais dans lesquels nous avons introduit dans le milieu d'autres électrolytes que le fluorure. Pour cette nouvelle série d'essais, le milieu fut laissé neutre, de façon à ne faire varier qu'un facteur à la fois.

3° VARIATION DU MILIEU PAR L'ADJONCTION DE SELS ETRANGERS

Nous avons choisi un sel neutre, d'abord le sulfate de sodium, et nous l'avons ajouté en quantités croissantes par rapport au fluorure.

a) Adjonction de sulfate de sodium.

1. ADDITION DE 80 mg. DE SULFATE DE SODIUM à 1 mg. de fluor, à l'état de fluorure de sodium, contenu dans environ 50 cm³ d'eau distillée :

α — Durée de passage du courant : 2 heures.

Dans ces conditions la température s'élève jusqu'à 37°. L'intensité du courant monte progressivement jusqu'à 140 milliampères et s'y maintient ; vers la fin de l'opération, elle décroît jusqu'à 120 milliampères.

Le dosage du fluor dans la liqueur anodique en décèle 75 p. 100; dans l'espace intermédiaire, 25 p. 100 subsistent.

Nous nous sommes assurée pour ce dosage, que la quantité de sulfate de sodium présente n'avait pas d'action sur la réaction colorée que nous utilisons. Pour cela nous avons fait — parallèlement — deux séries d'essais représentant deux gammes : l'une et l'autre étaient composées de quantités de fluor croissantes ; l'une des deux renfermait de plus, 50 mg. de sulfate de sodium dans chaque tube. Après addition d'acide chlorhydrique et de colorant, les tubes des deux séries avaient respectivement les mêmes couleurs. La quantité de sulfate ajoutée pour la comparaison — 50 mg. — devait correspondre à celle existant dans les liqueurs anodiques d'électrodialyse, étant donné la proportion de fluor retrouvée dans ces mêmes liqueurs.

β — Durée de passage du courant : 4 heures.

Dans les mêmes conditions, en présence de 80 mg. de sulfate de sodium, l'électrodialyse de fluorure de sodium (1 mg. en F), prolongée 4 heures, permet de retrouver à l'anode : 82 p. 100 de fluor, tandis que 17 p. 100 environ n'ont pas électrodialysé et sont retrouvés entre les deux membranes, à la fin de l'opération.

2. ADDITION DE 0 g., 50 DE SULFATE DE SODIUM à 1 mg. de fluor contenu dans environ 50 cm³ d'eau distillée :

α. — Durée de passage du courant : 2 heures.

La température monte à 34°, et l'intensité du courant augmente — du fait de l'accroissement de la teneur en

électrolytes — jusqu'à 160 milliampères ; elle diminue, en fin d'opération, à 120-130 milliampères.

Le dosage du fluor ne peut être fait directement, la présence du sulfate, dans cette proportion, étant un obstacle au dosage colorimétrique et le dosage a été précédé de l'isolement du fluor suivant la méthode de H.-H. WILLARD et O.-B. WINTER [107], que nous avons indiquée précédemment (page 42), et sur laquelle nous donnerons des détails plus loin.

Le dosage ne décèla, dans la liqueur anodique, que 50 p. 100 du fluor mis en œuvre.

β. — *Durée de passage du courant : 4 heures.*

Toutes les conditions étant identiques à celles de l'essai précédent, on retrouve à l'anode, en 4 heures : 62 p. 100 du fluor.

3. ADDITION DE 10 g. DE SULFATE DE SODIUM à 1 mg. (en F), de fluorure de sodium contenu dans environ 60 cm³ d'eau :

En présence de cette forte proportion de sel étranger, l'intensité du courant monte à 180 milliampères, et la température ne dépasse pas 24° pendant les 5 heures que nous avons fait durer l'opération.

Au bout de ce temps, le dosage du fluor nous montra que seulement 70 p. 100 avaient électrodialysé.

Ces essais nous ont permis de constater que le fluor électrodialyse de moins en moins rapidement en présence de quantités croissantes d'un sel étranger, bien que la présence d'un nouvel électrolyte ait pour résultat d'augmenter l'intensité du courant mis en œuvre.

Ainsi, en 5 heures, en milieu aqueux neutre, 1 mg. de fluor seul électrodialyse en totalité ; tandis que, dans le même temps, en présence de 10 g. de sulfate de sodium, seulement 70 p. 100 du fluor sont retrouvés à l'anode.

Le sel le plus commun et le plus abondant dans les liquides biologiques est le chlorure de sodium, dont la présence est constante. Afin de nous rapprocher des conditions toxicologiques, nous avons fait ensuite une série d'essais en présence de ce sel.

b) Adjonction de chlorure de sodium.

Un premier essai fut fait sur une solution de 40 cm³ d'eau renfermant 1 mg. de fluor, sous forme de fluorure de sodium, et 0 g., 35 de chlorure de sodium, que nous avons soumis à l'électrodialyse pendant 3 heures.

La température ne s'éleva pas à plus de 26° et l'intensité du courant monta à 150-160 milliampères.

Nous avons constaté que le dosage colorimétrique est impossible dans ce cas. En effet, le chlore, libéré en même temps que le fluor à l'anode, semble rester en solution à l'état ionisé et se retrouve au moment du dosage que son action décolorante empêche absolument.

La présence de chlorures étant la règle dans les milieux que nous aurions à traiter, nous avons étudié, en premier lieu, comment se faisait la répartition du chlore par rapport à celle du fluor, au cours de l'électrodialyse ; en second lieu, nous avons cherché s'il était possible d'éliminer le chlore qui inhibait le dosage colorimétrique.

1. ETUDE DE LA REPARTITION DU CHLORE AU COURS DE L'ELECTRODIALYSE

a.— Nous avons effectué l'électrodialyse d'une solution aqueuse de 40 cm³ environ, contenant 1 mg. de fluor, sous forme de fluorure de sodium, et 0 g., 35 de chlorure de sodium.

A l'anode, nous avons mis 40 cm³ d'eau distillée. Plusieurs fois, au cours de l'opération, nous l'avons prélevée et remplacée par une quantité égale d'eau.

Dans les diverses liqueurs anodiques ainsi recueillies, nous avons dosé le chlore par le procédé CHARPENTIER-

VOLHARD, et constaté que les différentes parties renfermaient :

— Pour la première heure	24 p. 100 de Cl
— pour la deuxième heure	18 p. 100 —
— pour les trois heures suivantes	15 p. 100 —
— de la cinquième à la huitième heure	4 p. 100 —

Au bout de ce temps, la solution à dialyser contenait encore 5 p. 100 de chlore. En tout, nous en avons retrouvé 66 p. 100, il y avait environ 34 p. 100 de pertes, sans doute constituées par du chlore dégagé dans l'atmosphère.

β. — Un second essai fut fait sur une solution identique de fluorure et de chlorure — 1 mg. de F, 0 g., 35 de $ClNa$ — mais en faisant les changements d'eau à l'anode plus fréquemment. Dans ces conditions, les résultats furent les suivants :

dans la 1 ^{re} demi-heure, il passe	18 p. 100 de Cl
— 2 ^e —	15 p. 100 —
— 3 ^e — —	13,5 p. 100 —
— 4 ^e — —	11,5 p. 100 —
— 5 ^e — —	8 p. 100 —
— 6 ^e — —	7 p. 100 —
non dialysé	10 p. 100 —

Dans ce cas nous retrouvons 82 p. 100 de fluor ; il y avait donc 18 p. 100 de pertes.

Nous nous sommes demandée si le dégagement du chlore ne pouvait entraîner celui du fluor et occasionner des pertes de ce dernier. Les essais ultérieurs nous ont montré qu'il n'en était rien, pour les doses minimales de fluor que nous employions.

2. DOSAGE SIMULTANE DU CHLORE ET DU FLUOR :

Nous avons fait l'électrodialyse d'une solution de chlorure et de fluorure de sodium.

Dans la liqueur anodique nous avons dosé le chlore par le procédé de CHARPENTIER-VOLHARD, et le fluor par le pro-

cédé de H.-H. WILLARD et O.-B. WINTER [107], suivi de l'élimination du chlore et du dosage colorimétrique.

Le passage du chlore se faisant ainsi que nous venons de le voir, pendant un temps assez long, et le procédé qui consiste à changer d'eau toutes les demi-heures pour l'éliminer au fur et à mesure n'étant pas d'une généralisation commode, nous avons essayé de prolonger la durée de l'électrodialyse.

De plus, nous avons interchangé la position des électrodes et placé l'anode dans l'enceinte extérieure, où nous pouvions la noyer dans un volume d'eau beaucoup plus grand (150 cm³ environ).

α. Un premier essai fut fait dans ces conditions sur une solution de 50 cm³ renfermant 0 g., 35 de ClNa et 1 mg. de F (sous forme de fluorure de sodium).

Nous avons laissé l'opération durer 15 heures de suite ; au bout de ce temps, la température était de 35° environ. L'intensité du courant, après avoir passé par un maximum de 150 milliampères, était de 120-130 milliampères.

Nous avons prélevé la liqueur anodique et nous l'avons remplacée par 150 cm³ d'eau distillée. Au bout de trois nouvelles heures, nous avons arrêté l'opération et fait les dosages.

La liqueur anodique prélevée après 15 heures, renfermait 36 p. 100 de Cl et 80 p. 100 de F.

La liqueur prélevée ensuite, après 3 heures — soit 18 heures après le début de l'opération — renfermait 4 p. 100 de Cl et 12 p. 100 de F.

Une grande partie du chlore s'était donc dégagée dans l'atmosphère. Le passage du fluor était assez bon, puisque, dans l'ensemble, il permettait d'en retrouver 92 p. 100.

β. — Un autre essai, dans les mêmes conditions, pour des quantités moindres de chlorure et de fluorure — 0 g., 25 de ClNa, 0 mg., 8 de F — décéla :

pour la première portion	75 p. 100 de F
pour la deuxième portion	19 p. 100 de F
il restait dans la solution à dialyser :	5 p. 100 de F.

Ces conditions opératoires semblant bonnes, nous avons essayé de les appliquer à des liquides biologiques.

4° ELECTRODIALYSE DU FLUOR DANS UN MILIEU BIOLOGIQUE :

Nous avons utilisé d'abord *le sérum*.

a. — Un premier essai porta sur 40 cm³ de sérum animal, additionné de 0 mg., 60 de F (sous forme de fluorure de sodium).

A l'anode, nous avons mis 150 cm³ d'eau.

L'intensité du courant est montée jusqu'à 160-170 milliampères, la température jusqu'à 28°. Nous avons laissé l'opération durer toute la nuit. Au bout de 15 heures, la liqueur anodique recueillie a été remplacée par 150 cm³ d'eau ; l'intensité du courant, qui était tombée à 100-120 milliampères, baissa encore, le prélèvement ayant appauvri le milieu en électrolytes.

Trois heures après le changement d'eau, la liqueur anodique fut recueillie, puis mélangée à la précédente. Le dosage effectué sur l'ensemble nous permit de retrouver 0 mg., 56, soit 93 p. 100 du fluor mis en œuvre.

Pour nous assurer que le temps de l'électrodialyse pour du sérum n'était pas inutilement prolongé, nous avons fait l'essai suivant :

b. — Electrodialyse de 50 cm³ de sérum, additionné de 0 mg., 60 de F (sous forme de fluorure de sodium), dans les conditions de l'essai précédent, sauf celle de durée qui fut seulement de 5 heures avant le changement d'eau et de 2 heures après.

On ne retrouve, dans la totalité des liqueurs anodiques, que 86 p. 100 de F. Ceci confirme la nécessité d'un temps de dialyse assez long dans les conditions où nous nous sommes placée.

γ. — Quelques autres essais, dans les conditions optimales que nous avons définies, portèrent sur des doses de fluor variant de 0 mg., 10 à 5 mg. ajoutées à du sérum en quantités variant de 30 à 60 cm³. Ces essais nous donnèrent des résultats assez satisfaisants, puisque nous retrouvions de 90 à 98 p. 100 de fluor, selon les cas.

δ. — Nous avons fait l'électrodialyse d'une bouillie aqueuse de foie d'agneau (25 g.) finement divisé aux ciseaux et trituré avec 0 mg., 60 de fluor et 25 cm³ d'eau.

En prolongeant l'électrodialyse 15 heures, en renouvelant l'eau à l'anode et laissant à nouveau 3 heures, le dosage du fluor dans l'ensemble des liqueurs anodiques nous permit de retrouver 0 mg., 59, soit 98 p. 100 du fluor présent, ce qui est un résultat satisfaisant.

Les essais d'électrodialyse du fluor, que nous avons pratiqués et que nous venons d'exposer, sont résumés dans le tableau suivant (pages 100 et 101), qui représente les conditions diverses dans lesquelles nous avons opéré et les résultats que nous avons obtenus, c'est-à-dire — pour chaque cas — le pourcentage de fluor ayant électrodialysé.

Les essais relatifs à la répartition et au dosage du chlore, n'ayant ici qu'un intérêt secondaire, ne figurent pas dans ce tableau.

Les essais relatifs au fluor y sont désignés par la lettre et le numéro qui figurent dans le texte, ce qui permet de se reporter rapidement à celui-ci pour obtenir le détail de chaque expérience.

Ce tableau montre l'intérêt qu'il y a, dès que le fluor est mélangé à des substances étrangères — sels ou matières organiques — à prolonger l'électrodialyse assez longtemps, à la faire en deux temps et à mettre à l'anode un volume d'eau relativement grand. En opérant de la sorte, ce procédé simple nous a donc permis de séparer le fluor des matières organiques dans des conditions très satisfaisantes.

Résumé des Essais

ESSAIS		VOLUME D'EAU A L'ANODE (en cm ³)	DURÉE DE PASSAGE DU COURANT (en heures)	TEMPÉRAT. EN FIN D'OPÉRATION	INTENSITÉ MAXIMA OBSERVÉE (en milli- ampères)	
1°	α	50	2	39°	< 20	
	β	50	3	38°	< 20	
	γ	50	4	< 40°	< 20	
	δ	50	5	< 40°	< 20	
	ε	30 + 30 + 30	1 + 1 + 1	30°	< 20	
2°	α	50	2	34°	< 20	
	β	50	2	32°	< 40°	
3°	1. {	α	50	2	37°	140
		β	50	4	< 40°	140
	2. {	α	50	2	34°	160
		β	50	4	< 40°	160
	3.	50	5	24°	180	
	b. 2. {	α	150 + 150	15 + 3	35°	160
		β	150 + 150	15 + 3	< 40°	160
4°	α	150 + 150	15 + 3	28°	170	
	β	150 + 150	5 + 2	< 40°	170	
	γ	150 + 150	15 + 3	36°	160	
	γ'	150 + 150	15 + 3	< 40°	170	
	δ	150 + 150	15 + 3	39°	160	

d'Électrodialyse

RÉACTION DU MILIEU	ÉLÉMENTS ÉTRANGERS AJOUTÉS :			FLUOR RETROUVÉ A L'ANODE (en p. 100)
	SO^4Na^2	ClNa	MILIEU ORGANIQUE	
neutre				85
—				95
—				98
—				100
—				99
basique (NH^3)				98
acide ($\text{CH}^3\text{CO}^2\text{H}$)				63
neutre	+ 80 mg.			75
—	+ 80 mg.			82
—	+ 0 g., 50			50
—	+ 0 g., 50			62
—	+ 10 g.,			70
—		+ 0 g., 35		92
—		+ 0 g., 25		91
—			+ 40 cm^3 sérum	93
—			+ 40 cm^3 sérum	86
—			+ 30 cm^3 sérum	95
—			+ 45 cm^3 sérum	96
—			+ 25 g. foie	98

Nous avons vu, au début de nos essais, que le milieu alcalin semblait favorable à l'électrodialyse du cation F^- . Pourtant, nous avons, par la suite, toujours opéré en milieu neutre, à cause de la présence constante de chlorures dans les milieux biologiques que nous étudions : en milieu alcalin, en effet, l'ion Cl^- a tendance à former des chlorates, hypochlorites, etc., dont l'action décolorante, soit directe, soit en milieu chlorhydrique (comme c'est le cas dans le dosage colorimétrique utilisant la réaction de J.-H. DE BOËR) est gênante.

Ainsi, l'électrodialyse fournit à l'anode une liqueur renfermant, à côté de la presque totalité du fluor, tous les autres cations du mélange, en particulier le chlore.

Il est nécessaire d'éliminer ces cations étrangers, et pour cela on procède à la distillation en milieu aqueux et perchlorique, en présence de silice, selon la technique de H.-H. WILLARD et O.-B. WINTER [107].

De cette manière, le fluor passe à l'état d'acide hydrofluosilicique entraînable à la vapeur d'eau qui, dans le distillat, se dédouble en acide fluorhydrique et silice. L'acide fluorhydrique est dissous et le chlore dégagé en même temps existe à ses côtés. Nous avons cherché à éliminer ce chlore dissous, qui entrave le dosage de l'acide fluorhydrique.

C. — ELIMINATION DU CHLORE.

Nous avons d'abord traité du fluorure de sodium par distillation en milieu perchlorique, à la manière habituelle de H.-H. WILLARD et O.-B. WINTER [107], mais en présence de quelques milligrammes de chlorure et chlorate de potassium, mélange générateur de chloré en milieu acide. Ainsi le distillat obtenu avait une odeur chlorée nette (odeur caractérisée de même dans le cas de sérum, et beaucoup moins marquée dans le cas de bouillies d'organes) et même une légère coloration jaune-verdâtre.

Le problème consistait à extraire totalement le chlore, en épargnant le fluor.

1° *Essai des charbons actifs :*

Des charbons actifs furent mis en contact avec le distillat :

- 6 heures, action insuffisante ; il y a encore décoloration du réactif ajouté.
- 12 heures ; il n'y a plus décoloration, mais le charbon a aussi fixé le fluor, dont on ne retrouve que des traces.

2° *Essai du noir Norit :*

Le noir végétal Norit (à raison de 1 ou 2 g.) est laissé en contact, avec un distillat d'environ 100 cm³ :

- 12 heures, action non suffisante.
- 24 heures, action suffisante dans quelques cas, non dans tous.
- 48 heures, action suffisante dans tous les cas.

De toutes façons, si l'on ne prend pas la précaution de laver le noir, après avoir filtré pour le séparer du liquide, on ne retrouve pas quantitativement le fluor. Il est nécessaire de laver deux ou trois fois avec quelques centimètres cubes d'eau pour avoir de bons résultats.

3° *Essai du Silicagel :*

Même en laissant en contact 24 ou 48 heures, nous n'avons obtenu aucun résultat par ce procédé qui n'élimine pas le chlore, et est donc à rejeter.

4° *Essai d'élimination par le vide :*

Après avoir exactement neutralisé le distillat, on le place dans un dessiccateur en relation avec une trompe à eau. Le vide ainsi produit permet au chlore de se dégager. On place d'ailleurs des charbons adsorbants à côté du récipient contenant la solution traitée — pour favoriser la fixation du Cl libéré. On constate le dégagement de chlore à mesure que l'air se raréfie dans le milieu, et on obtient de bons résultats en prolongeant l'action du vide assez longtemps, pendant 6 à 8 heures au moins.

Il est indispensable de neutraliser auparavant, sinon l'acide fluorhydrique se dégage de la solution quand le vide est fait, et le dosage n'en décèle que peu ou pas.

Il semble que ce procédé, qui n'introduit pas de substances étrangères dans la solution à titrer, soit à préférer pour éliminer le chlore.

A son défaut, on utilisera le procédé au noir Norit tel que nous venons de l'exposer.

En résumé, cette étude nous a montré que l'électrodialyse permettait de séparer le fluor des matières organiques dans des conditions satisfaisantes. Dans l'électrodialysat anodique, le fluor existe à côté des autres cations. On élimine ceux-ci au moyen de la distillation perchlorique.

Toutefois, le chlore subsiste, mais on peut l'enlever de la solution par un des moyens étudiés.

Dans le distillat, après élimination du chlore, nous avons essayé la méthode de dosage par spectrophotométrie : nous avons constaté qu'elle ne pouvait convenir, car il y a encore, après élimination du chlore dissous, des chlorures ainsi que le démontre le précipité obtenu par addition de nitrate d'argent à ce distillat. Ces ions Cl^- entravent le dosage spectrophotométrique, mais ils ne sont pas, à ces doses, un obstacle au procédé colorimétrique que nous avons utilisé pour les dosages de fluor au cours des essais d'électrodialyse.

Ceci nous a conduit à abandonner la méthode de dosage spectrophotométrique au profit de ce dosage colorimétrique.

CHAPITRE V

MÉTHODE UTILISÉE

La méthode que nous avons utilisée peut être divisée en quatre parties :

- I. — Elimination des matières organiques : électro-dialyse.
 - II. — Elimination des sels étrangers gênants pour le dosage : distillation par le procédé de H.-H. WIL-LARD et O.-B. WINTER [107].
 - III. — Elimination du chlore inhibant le dosage colorimétrique.
 - IV. — Dosage colorimétrique du fluor, selon la réaction de J.-H. DE BOËR [11].
-

Electrodialyse

Nous avons pratiqué l'électrodialyse dans une triple enceinte réalisée au moyen d'un cristalliseur, de 12 cm. de diamètre, et de deux manchons cylindriques en pyrex, de 9 et 6 cm. de diamètre, susceptibles d'être recouverts d'une membrane à leur partie inférieure évasée (fig. 4).

Ces cylindres et le cristalliseur délimitent, entre eux, trois espaces concentriques. L'espace extérieur A contient de l'eau distillée et l'anode ; l'espace intermédiaire B reçoit la bouillie organique à traiter ; l'espace intérieur C contient de l'eau distillée et la cathode.

Les électrodes sont en platine ; celles que nous avons utilisées sont constituées :

— l'anode, d'une plaque circulaire de 3 cm., 5 de diamètre,

— la cathode, d'une lame de 7 cm. sur 0 cm., 6.

L'une et l'autre sont soudées au fil de cuivre les reliant aux bornes du transformateur au moyen d'un tube de verre fondu, pour obtenir l'isolement du platine avec l'eau.

Les membranes sont constituées par de la cellophane en feuilles résistantes, définies par leur poids : 60 g. au m².

On les place quelques minutes dans l'eau distillée, pour les assouplir ; ensuite, elles sont appliquées sur les manchons et retenues avec une ficelle serrée à 2 cm. environ du bord, de façon à constituer des vases clos à leur partie inférieure.

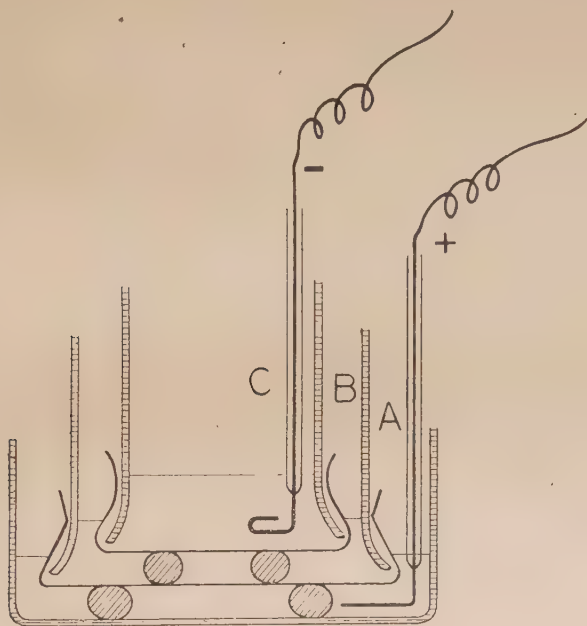


Fig. 4. — Appareil à électrodialyser.

A : Anode.

C : Cathode.

B : Enceinte intermédiaire recevant la bouillie d'organe.

Pour éviter les risques de déchirure des membranes, nous les changeons après chaque opération. Les membranes ne servant qu'une fois sont résistantes et nous n'avons jamais eu d'accidents dus à leur brisure.

Les manchons reposent sur des supports de verre constitués par des tubes coudés à angles aigus qui les isolent l'un de l'autre et du cristalliseur. Ces supports sont faits

au moyen de tubes de diamètre plus ou moins grand, selon l'importance de la bouillie à traiter et l'espace nécessaire à la contenir.

L'anode étant placée dans l'enceinte extérieure A et recouverte d'eau, on place sur un premier support le manchon le plus large, muni de son fond de cellophane, et l'on dépose en B la bouillie aqueuse obtenue à partir de l'organe finement divisé aux ciseaux, et trituré à l'eau distillée.

B reçoit également un second support en verre sur lequel on place le manchon le plus étroit, muni aussi de sa membrane, et à l'intérieur (en C) on verse de l'eau distillée dans laquelle va plonger la cathode. A ce moment, on donne le courant : c'est du courant continu, sous une tension de 120 volts.

L'écartement des électrodes est réduit au minimum permis par la position des manchons ; il est de 3 à 4 cm. dans l'appareil que nous utilisons.

Au bout de quelques minutes, on constate un dégagement gazeux sur les électrodes, abondant surtout à la cathode. Un milliampèremètre, placé en série sur le circuit, accuse alors une intensité de courant de quelques milliampères. Cette intensité augmente, et au bout de 15 à 20 minutes, elle est stabilisée à 120-180 milliampères, selon la résistance de la bouillie en expérience. En fin d'opération, l'intensité diminue toujours.

La température, dans les conditions où nous opérons, ne s'élève jamais à plus de 40° et, dans ce cas, nous avons vérifié qu'il n'y a pas de risques de perte de fluor.

Les électrodialyses que nous avons faites ont toujours été prolongées pendant 18 heures environ, en deux temps :

Au bout de 15 heures, on extrait à la pipette la liqueur anodique (environ 150 cm³) on la remplace par de l'eau distillée. Enfin, après trois nouvelles heures, la liqueur anodique, ainsi que les eaux de lavage du cristalloir et de l'anode, est ajoutée à la première portion prélevée.

Ces liqueurs sont généralement un peu colorées ou fluorescentes. Pour les organes conservés quelques mois avant le dosage, et putréfiés, elles sont franchement brunes, ce

qui met en évidence la désintégration des pigments organiques colorés en éléments plus petits, susceptibles de traverser les membranes.

Ces liqueurs acides, qui renferment tous les cations des organes — en particulier, le Cl^- à côté du F^- — sont neutralisées au tournesol, à la touche, au moyen d'un excès de soude diluée au 1/10 de façon à transformer en sel de sodium stable, l'acide fluorhydrique du mélange qui, sans cette précaution, se volatiliserait. Elles sont évaporées au bain-marie presque à siccité. Le résidu d'évaporation est distillé.

II

Distillation par le procédé de H.-H. WILLARD et O.-B. WINTER

a) Appareil employé.

Il est constitué par un petit ballon à distiller B, en pyrex, d'une contenance de 30 à 40 cm³, portant à la partie supérieure du col une tubulure latérale ; une autre tubulure, plus large sur la partie renflée du ballon, permet le passage d'un thermomètre T'. Le col est fermé par un bouchon que traverse une ampoule à brome A, dont l'extrémité est capillaire et plonge dans le liquide du ballon ainsi que le thermomètre T'. Le tube latéral est garni à l'intérieur avec du coton de verre et relié à un réfrigérant descendant R. Le coton de verre a pour but de s'assurer qu'il n'y a pas de particules liquides entraînées à la distillation : dans ce cas le coton se colore aussitôt.

On reçoit le distillat dans une éprouvette E. L'appareil est représenté sur la figure 5.

Le ballon est plongé dans un bain d'huile H, dont on apprécie la température au moyen d'un thermomètre T.

Avant tout essai, on doit s'assurer de l'étanchéité des trois bouchons que comporte l'appareil. Celui qui supporte

le thermomètre étant très près du liquide est vite corrodé et doit être changé pour chaque opération.

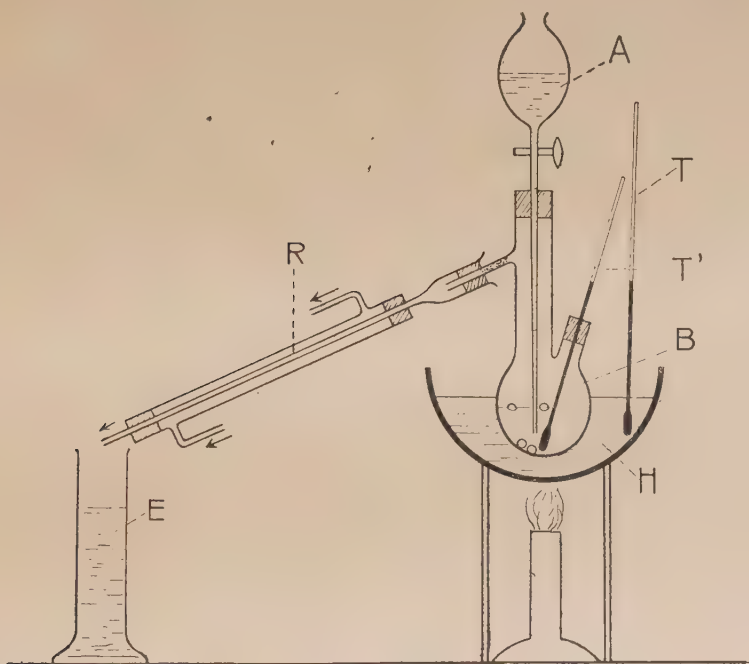


Fig. 5. — Appareil à distiller.

- B : Ballon à distiller.
- A : Ampoule à brome.
- R : Réfrigérant.
- E : Eprouvette servant à recueillir le distillat.
- H : Bain d'huile.
- T : Thermomètre du bain.
- T' : Thermomètre indiquant la température à l'intérieur du ballon.

Celui qui supporte l'ampoule à brome doit être ajusté de telle façon que l'extrémité du tube capillaire plonge juste dans le mélange quand celui-ci bout à 135° — un peu de pratique définit sa position. On constate rapidement qu'il est préférable de ne pas faire plonger le tube capillaire tout au fond du ballon, l'addition d'eau par le tube

au cours de l'opération étant dans ce cas accompagnée de soubresauts brutaux, qui risquent d'entraîner des particules liquides à la distillation.

Enfin, le bouchon qui supporte le tube latéral en communication avec le réfrigérant est aussi convenablement ajusté avec ce dernier.

b) Mode opératoire.

L'appareil étant lavé à l'eau distillée, on introduit au fond, au moyen d'un entonnoir à long tube, le résidu d'évaporation des liqueurs anodiques neutralisées de l'électrodiolyse ; on lave la capsule avec quelques centimètres cubes d'eau, on ajoute environ 5 cm³ d'acide perchlorique (à 60 p. 100) qu'on passe successivement dans la capsule, puis dans le ballon, de façon à entraîner tout le résidu ; on lave à nouveau à l'eau la capsule, et l'entonnoir intérieurement et extérieurement, avec un jet de pissette. En opérant de la sorte, la moitié environ du volume du ballon est occupée par le mélange acide. On ajoute deux perles de verre qui fourniront la silice nécessaire et quelques morceaux de pierre-ponce pour régulariser l'ébullition. On ferme le ballon par le bouchon supportant l'ampoule à brome pleine d'eau distillée, dont le robinet est fermé. On plonge le ballon dans le bain d'huile et l'on ajuste au réfrigérant. On chauffe alors le bain jusque vers 150°. La température à l'intérieur du ballon monte progressivement et l'ébullition se produit vers 105-110°. Grâce à la pierre-ponce, elle se fait lentement et régulièrement, si l'on prend la précaution de ne pas trop chauffer le bain d'huile au début.

L'acide hydrofluosilicique formé au sein du mélange aqueux est entraîné par la vapeur d'eau et la température à l'intérieur du ballon monte lentement ; à mesure qu'elle s'élève et que le volume de liquide diminue dans le ballon, l'eau distillant, on monte la température du bain d'huile jusqu'à 170-190°, quand l'intérieur est à 135°. On maintient alors le bain à cette température.

Dans certains cas, la distillation peut être accélérée, en augmentant la température du bain jusqu'à 200°. Mais, en général, quand on traite des électrodialysats d'organes, si l'on chauffe trop, le contenu du ballon peut mousser et être entraîné ; il est donc préférable de ne pas dépasser 180°.

On maintient alors la température à 135° à l'intérieur, en ajoutant de l'eau au moyen de l'ampoule à brome, dont on ouvre le robinet. Pratiquement, on ajoute l'eau quand la température intérieure atteint 140°, jusqu'à ce qu'elle soit descendue aux environs de 130°.

Ainsi la distillation est continue, et on obtient 75 cm³ de distillat en 2 à 3 heures.

L'expérience nous a montré, sur des essais divers et nombreux, que le fluor, à des doses variant de quelques milligrammes à quelques fractions de milligramme, était presque entièrement entraîné dès que 50 à 60 cm³ de liquide avaient distillé et que, si l'on pousse la distillation après 75 cm³, les liquides recueillis ensuite n'en renfermaient plus.

Nous avons donc arrêté systématiquement nos distillations quand 75 cm³ de distillat étaient obtenus.

Après refroidissement, on lave le réfrigérant. Le distillat aqueux renferme les produits de dissociation de l'acide hydrofluosilicique [75] : en effet, cet acide est très hydro-lisable en solution diluée, comme c'est le cas ; on a donc de l'acide fluorhydrique en solution et de la silice en suspension.

A côté de ces produits, le distillat renferme toujours du chlore. Or, ce chlore, par son action décolorante, empêche absolument le dosage colorimétrique, basé sur la réaction de DE BOËR, que nous voulions utiliser.

III

Elimination du chlore

Nous pensions employer l'action du vide — en présence de charbons actifs. En fait, nos premiers essais, pratiqués sur des organes putréfiés, nous fournirent toujours des distillats un peu colorés. (La présence du coton de verre dans le tube à distiller nous permit de vérifier qu'il n'y avait pas eu de liquide entraîné hors du ballon.)

Après avoir fait agir le vide, il était nécessaire de passer au noir Norit, pour éliminer cette coloration jaune pâle, susceptible de nuire au dosage.

Pour ne pas multiplier les manipulations, nous avons donc abandonné le vide, pour utiliser systématiquement l'action seule du noir Norit.

Dès que la distillation est terminée, on ajoute dans l'éprouvette 1 à 2 g. environ de noir Norit et l'on agite. Ce mélange est laissé en contact pendant 48 heures, au cours desquelles on agite deux ou trois fois. Au bout de ce temps, on filtre pour séparer le noir, le filtre est lavé plusieurs fois à l'eau distillée pour obtenir un volume de 100 cm³ exactement et généralement on fait le dosage colorimétrique sur la moitié, ou, s'il est nécessaire, sur une portion aliquote plus petite.

Toutefois, pour les petits organes où le fluor était susceptible d'exister en très faibles quantités, nous avons évaporé au bain-marie le filtrat neutralisé au préalable (pour éviter la volatilisation de l'acide fluorhydrique en solution), de façon à concentrer l'ensemble à 50 cm³, et à faire le dosage sur la totalité de l'essai. Dans ce cas, la neutralisation ne nécessite d'ailleurs que quelques gouttes de soude diluée, dont la présence est négligeable pour le dosage fait en milieu fortement chlorhydrique.

IV

Dosage colorimétrique selon la réaction de J.-H. de BOER

On prépare une échelle au moyen d'une solution titrée de fluorure de sodium renfermant 22 mg., 1 de sel par litre ce qui correspond à 0 mg., 01 de fluor par centimètre cube.

On met dans une série de tubes de Nessler :

2 cm ³ 5	de solution	correspondant à	0 mg., 025	de F
5 cm ³	—	—	0 mg., 05	—
7 cm ³ 5	—	—	0 mg., 075	—
10 cm ³	—	—	0 mg., 10	—
12 cm ³ 5	—	—	0 mg., 125	—
etc.				

Chaque tube est complété à 50 cm³ avec de l'eau distillée.

L'essai lui-même, ou plutôt la série des essais — car une gamme sert aisément pour 6 à 10 dosages — porte sur 50 cm³ ou une portion plus petite complétée à 50 cm³ avec de l'eau distillée.

Dans toute la série, on ajoute à la burette 15 cm³ d'acide chlorhydrique pur ; puis, au moyen d'une pipette ou d'une micro-burette, 5 cm³ du réactif à l'alizarine-sulfonate de sodium et nitrate de zirconium récemment préparé (voir p. 65).

On agite chaque tube, et au bout de quelques minutes, si l'on constate que certains essais ont déjà une teinte jaune marquée, susceptible de sortir de la gamme, on fait rapidement pour eux d'autres tubes au moyen de parties aliquotes plus petites.

Au bout d'une demi-heure, la coloration des tubes de la gamme est déjà bien développée, et le contenu des tubes les moins riches en F commence à précipiter. On laisse encore en contact, et 1 heure et demie à 2 heures après le début de l'opération, on agite à nouveau chaque tube, et l'on compare les essais aux témoins. On effectue la comparaison directement sur une surface blanche.

On peut très bien apprécier le 1/40 de milligramme, et même moins, car on peut encore faire la différence par exemple entre le tube 0 et le tube 0 mg., 025 et déceler plus de fluor que dans le premier et moins que dans le second. On arrive ainsi à évaluer le 1/100 de milligramme.

On ne fait pas toujours l'ensemble de la gamme, et si l'on opère sur de petites quantités d'organes renfermant peu de fluor, la préparation des dix premiers tubes suffit. Nous avons vu qu'on ne pouvait utiliser la gamme que pour la série d'essais préparée en même temps qu'elle.

Cette technique de séparation et de dosage du fluor nous a donné d'excellents résultats et nous a permis d'entreprendre l'étude toxicologique de cet élément.

- - - - -

CHAPITRE VI

TOXICOLOGIE EXPERIMENTALE

A mesure que l'hygiène industrielle fait des progrès et préoccupe un plus grand nombre de techniciens, de nombreuses substances apparaissent douées d'une toxicité réelle et sont susceptibles, à des doses faibles — mais répétées — de provoquer un état pathologique pouvant se traduire par des accidents plus ou moins graves.

Pour le fluor, dès 1900, on avait signalé en Prusse des accidents parmi les ouvriers d'une usine à superphosphates, accidents qui furent reconnus imputables à l'acide fluorhydrique [27].

Depuis quelques années, les cas d'intoxication d'origine industrielle dus au fluor se sont multipliés, et H. CRISTIANI a constaté, au voisinage des usines à électrolyse de la bauxite [24] [33], des accidents se manifestant surtout par un état cachectique.

Si l'intérêt du fluor, au point de vue hygiène industrielle, a été signalé depuis plusieurs années, peu d'auteurs ont essayé de reproduire expérimentalement les accidents observés.

J. BRANDL et H. TAPPEINER [14] soumièrent des chiens à une intoxication fluorique chronique et trouvèrent dans l'os une quantité de fluor supérieure à celle existant normalement. Toutefois, étant donné le peu de précision de la méthode qu'utilisèrent ces auteurs, leur résultat n'a qu'une valeur approximative.

H. CRISTIANI [29] [30] [34] [35] soumit des animaux à un régime suffisant, mais constitué en partie par du fourrage provenant du voisinage des usines d'aluminium.

L'auteur constata, au bout de plusieurs mois, les troubles caractéristiques de la fluorose : amaigrissement, cachexie, mais ne dosa pas le fluor dans les organes des animaux ayant succombé à l'intoxication.

D'autres auteurs, après avoir reconnu la présence du fluor dans les eaux ayant traversé des sols phosphatés, ont fait des essais d'intoxication sur des rats, auxquels ils font absorber de telles eaux ou les phosphates eux-mêmes.

Mais ni Ch. TOLLE et L.-A. MAYNARD [93], ni H. VELU [97] [98], ni F.-J. MAC CLURE et H.-H. MITCHELL [67] ne donnent de chiffres renseignant sur la localisation du fluor.

Nous avons pensé devoir reprendre cette question, ayant une technique de dosage du fluor parfaitement au point.

Cette méthode nous permet non seulement de doser le fluor dans les principaux viscères, mais encore d'étendre notre étude aux petits organes, telles les glandes endocrines.

Grâce à elle nous pouvons faire l'étude de la répartition érythro-plasmatique du fluor et obtenir des résultats intéressants, l'élimination par les excréta — bile, fèces, urine — peut être suivie.

Choix de l'animal d'expérience :

Les souris, les rats, les cobayes, quoique étant des animaux de laboratoire d'usage courant, ont été éliminés pour deux raisons :

Leur faible poids conditionne des organes de très petite taille, difficiles à séparer — quand il s'agit de l'hypophyse par exemple — et même pour des pourcentages de fluor importants, la quantité absolue de ce toxique susceptible d'être retrouvée serait très faible, ce qui augmenterait les causes d'erreur.

Nous avons pensé utiliser le chien, mais cet animal est de plus en plus difficile à se procurer, et son entretien dans un laboratoire, surtout quand on veut réaliser des intoxications chroniques, est une source d'ennuis.

Nous avons donc décidé d'utiliser le lapin, dont les organes sont suffisamment gros et l'entretien facile.

Choix de la voie d'introduction du toxique :

La voie d'introduction la plus naturelle était la voie buccale.

Il ne fallait pas songer à mettre dans les aliments le toxique à absorber, car aux fortes doses nécessaires pour provoquer une intoxication aiguë l'animal ne touchait pas à la nourriture.

Nous avons pensé faire absorber le toxique à l'aide d'une sonde œsophagienne ; mais l'animal en rejette toujours une certaine quantité, si ce n'est par les vomissements, tout au moins au moment où l'on enlève la sonde, et comme nous voulions connaître exactement la quantité de fluor administrée, nous avons abandonné ce mode d'absorption.

Nous avons décidé de réaliser les intoxications en administrant le fluor à l'animal par injections sous-cutanées. Ce procédé n'offre que des avantages : la dose donnée à l'animal est rigoureusement connue et il est plus aisé de faire une injection à un animal que de lui faire ingérer de force un produit.

Choix de la forme d'administration du toxique :

Pour l'introduction du fluor dans l'organisme, nous avons utilisé le sel soluble de l'acide fluorhydrique le plus courant : le fluorure de sodium. Ce sel a toujours été administré en solution aqueuse.

Pour les intoxications aiguës, nous avons dû employer la solution saturée, puisque la solubilité du fluorure de sodium dans l'eau n'est que de 4 p. 100.

L. GOLDEMBERG [52] avait signalé — lorsque l'administration était faite par voie sous-cutanée — des escarres locales à l'endroit injecté. Nous avons pensé que, peut-être, ces escarres seraient évitées en injectant des solutions sté-

riles, à pH voisin de 6, et nous avons mis en ampoules les solutions de fluorure destinées aux intoxications chroniques, après les avoir ajustées au pH : 6,2. Malgré ces précautions cependant, nous avons constaté que les lapins recevant des solutions concentrées de fluorure de sodium avaient rapidement une nécrose locale des tissus au voisinage du point d'injection, alors que les lapins recevant des solutions relativement diluées ne présentaient aucun accident local.

Si, pour les intoxications aiguës, les solutions concentrées et même saturées peuvent être utilisées, il est préférable, pour les intoxications chroniques, dans lesquelles l'injection est répétée journellement, de n'utiliser que des solutions diluées.

Nous avons réalisé chez l'animal deux sortes d'intoxications : des intoxications aiguës et des intoxications chroniques.

I

Intoxications aiguës

Dans les intoxications aiguës signalées à propos du fluor, les experts chargés de la détermination du toxique se sont préoccupés de le caractériser et de le doser dans les vomissements ou dans les aliments restant dans le tube digestif, mais n'ont pas cherché sa localisation dans les différents organes. Nous avons réalisé quelques intoxications aiguës en vue d'étudier cette répartition.

Pour chaque animal, nous avons prélevé tous les organes, y compris les glandes endocrines — surrénales, thyroïdes, parathyroïdes et hypophyse. Pour ces deux dernières, nous avons fait le dosage sans avoir éliminé la matière organique par électrodialyse, l'action de l'acide perchlorique suffisant à détruire la faible quantité de matière organique que ces glandes représentent.

Les testicules et l'épididyme ne furent pas séparés et le dosage du fluor fut effectué sur l'ensemble.

Dans tous les cas, nous avons isolé la vésicule biliaire du foie, afin de prélever la bile pour y effectuer le dosage du fluor.

Nous allons relater quelques essais d'intoxication aiguë. Après avoir noté les symptômes observés au cours de celle-ci, nous indiquerons les lésions relevées à l'autopsie, puis

dans un tableau les résultats obtenus quant à la localisation du fluor.

Lapin C.

Un lapin mâle, pesant 2 kg., 490, reçut en injections sous-cutanées du fluorure de sodium en solution saturée.

La marche de l'expérience fut la suivante :

A 11 h. 35, le lapin reçoit 0 g., 50 de fluorure de sodium ; il ne manifeste pas de souffrance.

A 11 h. 45, il reçoit une nouvelle injection de 0 g., 50 de fluorure.

A 11 h. 50, nous lui injectons 0 g., 25 du toxique. Dès ce moment, l'animal commence à saliver ; cette sialorrhée continuera abondamment jusqu'à la mort. Les contractions musculaires apparaissent en même temps que les premiers symptômes d'asphyxie.

A 12 h. 10, l'animal reçoit encore 0 g., 25 de fluorure.

A 12 h. 30 : 0 g., 50 ; les contractions musculaires s'accroissent ainsi que la salivation.

A 12 h. 45, nous injectons encore 0 g., 50 de fluorure. L'animal a de la difficulté à respirer, des contractions de plus en plus marquées, et enfin, à 13 h. 5, il meurt, ayant reçu, par voie sous-cutanée, 2 g., 50 de fluorure de sodium en 1 h. 30.

A l'autopsie, faite immédiatement, on remarqua une rigidité cadavérique très grande.

L'arrêt du cœur s'était fait en systole.

Les muscles et les sphincters étaient contractés, la vessie pleine ; le pylore était très dur.

Il y avait un peu d'œdème du poumon et de congestion cérébrale.

Nous avons noté un retard à la coagulation du sang.

Nous avons observé sous la peau la présence d'un liquide, ce qui semble dû au fait qu'une partie de la solution injectée ne fut pas résorbée. Ceci explique, dans une certaine me-

sure, la grande quantité de fluorure nécessaire pour tuer l'animal par voie sous-cutanée.

Nous avons prélevé le cerveau d'une part, le cervelet et le bulbe d'autre part, afin de rechercher s'il y avait fixation élective sur une partie de l'encéphale.

Voici, résumés en un tableau, les résultats des dosages effectués sur les viscères du lapin C :

RÉPARTITION DU FLUOR DANS LES ORGANES D'UN
LAPIN DE 2 KG., 490 AYANT REÇU, PAR VOIE SOUS-CUTANÉE,
2 G., 50 DE FNa EN SOLUTION SATURÉE :

ORGANES OU TISSUS PRELEVÉS	POIDS DE L'ORGANE OU DE LA PRISE D'ESSAI (en g.)	FLUOR TROUVÉ (en mg.)	F EN MG. POUR 100 G. D'ORGANES
Foie	102	1,87	1,83
Reins	14,5	0,24	1,65
Poumons	13	0,33	2,53
Cœur	7,5	0,10	1,33
Muscle : Quadriceps fémoral	42	0,67	1,59
Cerveau	9	0,15	1,66
Cervelet et bulbe	3,5	0	—
Testicules	9,5	0,06	0,63
Pancréas	5	0,02	0,4
Rate	0,890	0,09	10,1
Thyroïdes	0,189	0	—
Surrénales	0,313	0,13	41,5
Parathyroïdes	0,049	0	—
Hypophyse	0,019	0,01	52,6
Sang	10,5	0,15	1,43
Bile	2	0,13	6,5
Urine	100	1,53	1,53

Remarque. — L'urine contenue dans la vessie a été ajoutée à celle recueillie au cours de l'intoxication ; le tout a été évaporé et distillé directement. Le dosage a été effectué dans le distillat selon la manière habituelle.

Ce tableau montre que les quantités de fluor retrouvées dans les divers organes du lapin *C* sont très faibles, par rapport à la grande quantité de fluorure administrée.

Pourtant les taux retrouvés sont appréciables et très supérieurs à ceux qui existent normalement dans l'organisme qui, même dans les organes les plus riches, ne dépassent pas 0 mg., 50 pour 100 g. d'organes.

Le pourcentage dans le poumon est légèrement plus élevé que dans les autres organes — foie, reins, cœur — et ceci est en accord avec le fait que le poumon a été le siège de lésions caractéristiques.

Le cerveau renferme un pourcentage de fluor comparable à celui existant dans les autres organes, mais nous n'avons pu en déceler dans le cervelet ni dans le bulbe.

Le pancréas et les testicules en contiennent un taux relativement faible et très voisin de la teneur normale. Il en est de même pour le sang.

Par contre, la rate qui, normalement, ne renferme que des proportions assez minimales (0 mg., 20 pour 100g.) nous a donné des chiffres particulièrement élevés : 10 mg., 1 pour 100 g.

Parmi les endocrines, les thyroïdes et les parathyroïdes ne contiennent pas de fluor tandis que l'hypophyse et les surrénales en renferment une grande quantité.

Si les chiffres obtenus n'ont pas, pour ces organes, une valeur absolue, étant donné leur poids qui — pour les plus petits — est de quelques milligrammes, l'intérêt qui s'y attache est, malgré tout, réel. En effet, si nous avions fait les dosages dans une quantité équivalente d'un organe quelconque, nous n'aurions rien retrouvé, alors que le changement de coloration obtenu — pour l'hypophyse par exemple — était très appréciable.

Si par rapport à la quantité de fluorure injectée nous ne retrouvons pas un taux de fluor élevé — 1 mg., 53 dans les 100 cm³ d'urine recueillis au cours de l'intoxication — ce taux est cependant bien supérieur à la teneur en fluor de l'urine d'un lapin normal (0 mg., 03 pour 100 cm³).

Dans la bile nous retrouvons un pourcentage de fluor notable, ce qui prouve une élimination certaine, mais peu importante, par les matières fécales.

Nous avons remarqué à l'autopsie du lapin, la présence, sous la peau, de solution de fluor non résorbée, ce qui explique non seulement la grande quantité de fluorure qu'il a fallu injecter pour obtenir la mort de l'animal, mais aussi les proportions relativement faibles retrouvées dans les divers organes.

Pour obtenir une intoxication aiguë rapide, nous avons pensé utiliser la voie intra-veineuse, et, pour diminuer les chances d'erreur dans le calcul des pourcentages du fluor retrouvé, nous avons employé pour cet essai un animal plus gros, le chien.

Chien R.

Un chien, pesant 6 kg., 500, regut, par injection dans la saphène, 1 g. de fluorure de sodium dissous dans 25 cm³ d'eau environ, c'est-à-dire sous forme de solution saturée.

L'animal ne sembla manifester aucune souffrance et mourut au bout de quelques minutes.

La rigidité cadavérique apparut très vite après la mort. A l'autopsie, on constata une légère congestion cérébrale et de l'œdème du poumon. Les autres organes avaient l'apparence normale. La coagulation sanguine était retardée.

Nous avons dosé le fluor dans quelques organes :

RÉPARTITION DU FLUOR DANS LES ORGANES D'UN CHIEN
DE 6 KG., 500 TUÉ PAR INJECTION DANS LA SAPHIÈNE
DE 1 G. DE FNa EN SOLUTION AQUEUSE SATURÉE :

ORGANES PRÉLEVÉS	Poids de l'organe en g.	Prise d'essai en g.	Fluor retrouvé dans la prise d'essai en mg.	Fluor retrouvé dans l'organe entier en mg.	Fluor en mg. pour 100 g de tissus
Foie	509	27	1,45	27,3	5,36
Reins	59	24	3,4	8,35	14,1
Poumons . .	84	18	0,55	2,56	3,05
Cœur	56	27	0,3	0,62	1,11
Pancréas . .	31,2	15	2	4,13	13,3
Rate	15,5	10	0 25	0,38	2,5
Sang		64	22,5		35,1

Les résultats obtenus ne sont pas du tout comparables à ceux mentionnés pour le lapin *C*. Ceci n'a rien qui puisse nous étonner, étant donné la voie d'introduction, bien différente de la précédente, et la mort beaucoup plus rapide de l'animal.

C'est ainsi que nous retrouvons un taux important du fluor dans le sang : 35 mg., pour 100 g., alors que le sang du lapin *C* renfermait un taux très peu différent du taux normal : 1 mg., 43.

Cette quantité s'explique par le fait que le produit injecté n'a pas eu le temps de se répartir totalement dans les organes et qu'une partie est restée dans le torrent circulatoire.

On admet généralement que le poids du sang d'un chien est le 1/12 du poids de l'animal. Pour le chien *R*, le poids du sang serait de 540 g. Dans le sang total, la quantité de

fluor retrouvée est donc de 190 mg. en F, soit 420 mg. en fluorure de sodium.

42 p. 100 du fluoruré de sodium injecté sont donc restés dans le sang.

Le taux de fluor dans le pancréas est particulièrement élevé puisqu'il atteint 13 mg., 3 pour 100 g.

Ceci différencie encore l'intoxication aiguë par voie intra-veineuse de celle par voie sous-cutanée où, pour ce même organe, le taux retrouvé était de 0,4 p. 100.

Devant ces résultats dissemblables, il nous a paru intéressant de parfaire la comparaison entre ces modes d'introduction du toxique, en réalisant l'intoxication sur des animaux identiques, ce qui nous a amenée à répéter l'essai précédent sur un lapin.

Lapin H.

Un lapin mâle, pesant 2 kg., 510, reçut par injection dans la veine marginale de l'oreille une dose de fluorure de sodium de 0 g., 50 en solution aqueuse saturée. L'injection fut faite très lentement afin d'éviter les accidents dus à l'introduction dans la veine de liquide hypertonique.

L'animal fut pris aussitôt de contractions musculaires, convulsions tétaniques et trismus, qui aboutirent à la mort en une minute environ.

A l'autopsie on trouva le cœur en systole. Il y avait une hémorragie générale et le sang, non coagulé, baignait les divers organes. Nous avons pu en prélever une quantité importante qui, agitée en présence de billes de verre pour la défibriner, puis centrifugée aussitôt, nous permit de séparer les globules du plasma et d'étudier la répartition érythro-plasmatique du fluor. Toutefois, le plasma était légèrement hémolysé.

Le cerveau était congestionné, ainsi que les thyroïdes. La vessie était pleine, ce qui manifeste une contraction intense des muscles, et des sphincters en particulier.

Cette contraction musculaire était encore plus sensible à l'examen du tube digestif : l'estomac était tellement con-

tracté que, pendant l'autopsie, il éclata littéralement en trois endroits, en formant des boutonnières à sa surface. Les anses intestinales avaient une consistance très dure.

Nous avons prélevé les divers viscères et les glandes endocrines ; l'encéphale — cerveau, cervelet, bulbe — a été l'objet d'un prélèvement unique.

Le trismus constaté chez l'animal nous a donné l'idée de séparer les masséters et d'y rechercher le fluor pour comparer le résultat à celui fourni par une autre masse musculaire, le quadriceps fémoral par exemple.

Les résultats des dosages dans les divers organes sont résumés dans le tableau suivant :

RÉPARTITION DU FLUOR DANS LES ORGANES D'UN LAPIN
DE 2 KG., 510 AYANT REÇU EN INJECTION DANS LA
VEINE MARGINALE DE L'OREILLE 0 G., 50 DE FNa
EN SOLUTION AQUEUSE.

ORGANES OU TISSUS PRELEVES	POIDS DE L'ORGANE OU DE LA PRISE D'ESSAI (en g.)	FLUOR TROUVÉ (en mg.)	F EN MG. POUR 100 G. D'ORGANES
Foie	93	46,5	50
Reins	18	1,2	6,6
Poumons	10	3,4	34
Cœur	5,07	0,58	11,4
Muscle : Masséters ..	11,40	0,68	5,96
Muscle : Quadriceps fémoral	40	0,54	1,35
Encéphale	7,96	0,075	0,94
Testicules	6,27	0,07	1,11
Pancréas	3,28	0,35	10,6
Rate	1,267	0,12	9,4
Thyroïdes	0,139	0,07	50,3
Surrénales	0,634	0,12	18,9
Hypophyse	0,022	0,03	136
Urine	55	0,76	1,38
Globules	11	5,2	47,2
Plasma	11	10,5	95,4
Sang total	11	7,85	71,3

Remarque. — L'urine contenue dans la vessie a été prélevée, puis distillée directement après évaporation. Le mélange avec l'acide perchlorique avait de grandes tendances à mousser au cours de la distillation, et celle-ci a dû être conduite avec précaution et a duré 4 à 5 fois plus de temps que les autres.

Nous retrouvons, là encore, un pourcentage important de fluor dans le sang. En admettant que le poids du sang d'un lapin est le $\frac{1}{20}$ du poids de l'animal, le sang total du lapin *H* pesait 125 g. La teneur en fluor de la totalité du sang est ainsi égale à 90 mg. en fluor, soit environ 200 mg. en fluorure de sodium.

40 p. 100 du fluorure injecté sont donc restés dans le sang.

Ce résultat est donc tout à fait en harmonie avec ce que nous avons trouvé pour le chien *R*.

Nous avons recherché, non seulement le taux du fluor dans le sang total, mais aussi la répartition dans les globules et le plasma. Nous avons trouvé environ deux fois plus de fluor dans le plasma que dans les globules.

On peut se demander si une telle répartition érythro-plasmique est le fait, uniquement, de l'introduction brutale de toxique dans le milieu sanguin et si elle ne se modifierait pas ultérieurement. Ce point particulier très intéressant, demande à être éclairci et ce sera une de nos préoccupations dans l'étude de l'intoxication chronique.

Dans les viscères — foie, reins, poumons, cœur, — nous retrouvons un taux de fluor très notablement supérieur à ceux que nous avons notés dans l'intoxication aiguë par voie sous-cutanée.

Le taux, dans l'encéphale et dans la rate est, par contre, tout à fait analogue. Le pancréas a retenu un taux élevé de fluor : ceci est comparable à ce que nous avons déjà observé pour le chien *R*.

Nous retrouvons du fluor en proportions importantes dans toutes les glandes endocrines : la thyroïde, dans laquelle nous n'avons pas décelé de fluor dans l'intoxi-

cation par voie sous-cutanée, a ici un pourcentage de fluor de 50 mg., 3 pour 100 g.

Ces proportions élevées dans les glandes endocrines s'expliquent parfaitement par la riche vascularisation de ces organes.

Enfin, nous notons, par l'examen de ces chiffres, un fait très intéressant : les masséters contiennent environ 5 fois plus de fluor que le quadriceps fémoral.

Tous ces résultats, quoique fort importants par eux-mêmes doivent être complétés par l'étude de la localisation du fluor dans les intoxications chroniques.

En effet, si tel organe a retenu plus de fluor que tel autre lors de l'introduction du toxique par voie intra-veineuse, cela tient-il uniquement à la plus riche vascularisation du premier par rapport au second, ou à toute autre raison ?

La connaissance de la répartition du fluor dans les intoxications chroniques éliminera, en grande partie, le facteur vascularisation dont l'importance est d'autant plus grande que la mort de l'animal suit de plus près le moment de l'introduction du toxique.

Si nous prenons l'exemple typique de la répartition érythro-plasmatique, on voit nettement que, même si le globule sanguin a une affinité particulière pour le fluor, dans l'intoxication aiguë telle que nous l'avons réalisée pour le lapin *H*, il était évident que le plasma pouvait renfermer une plus grande proportion du toxique introduit.

Toutes ces considérations et surtout l'intérêt qui s'attache aux intoxications chroniques pour l'hygiène industrielle, nous ont amenée à faire l'étude expérimentale de celles-ci.

Intoxications chroniques

En dehors des organes que nous avons prélevés sur les animaux ayant été soumis à une intoxication aiguë, nous avons recherché, chez les lapins ayant subi une intoxication chronique, la quantité de fluor fixée dans l'os, les dents, les poils. En effet, les auteurs s'accordent à admettre que le fluor s'accumule dans les os et les phanères, et il était intéressant de mettre en parallèle les taux de fluor retrouvés dans ces tissus, après intoxications chroniques plus ou moins prolongées, avec ceux existant normalement chez le lapin.

Afin d'avoir des termes de comparaison, nous avons étudié le taux du fluor dans l'os, les dents et les poils d'un lapin de même espèce (lapin vulgaire, à poil gris). Pour les poils, en particulier, cette considération avait une importance assez grande, si l'on se reporte aux chiffres que donna A. GAUTIER [49] sur le fluor normal dans des cheveux et poils de couleurs différentes. Ces chiffres, en effet, sont, par exemple, de 15 mg. pour 100 g. de cheveux noirs et

11 mg. pour 100 g. de cheveux blonds, et varient aisément du simple au double chez le chien suivant l'espèce et la couleur du pelage.

Le dosage du fluor dans ces tissus a été précédé d'une macération chlorhydrique : les os et les dents ont été mis en contact 20 jours avec de l'acide chlorhydrique dilué au 1/10 environ.

Au bout de ce temps, les organes étaient assez ramollis pour qu'on pût les diviser finement aux ciseaux. La bouillie acide obtenue fut soumise à l'électrodialyse et le dosage achevé dans les conditions habituelles. L'élimination du chlore dans ces cas a nécessité une grande quantité de noir Norit, mais elle a été parfaite.

Les poils ont été brûlés dans une capsule, et le charbon obtenu a été mis à macérer dans l'acide chlorhydrique dilué de la même façon.

Les résultats que nous avons obtenus chez le lapin normal sont :

— pour l'os	12 mg.,	de F. pour 100 g.
— pour les dents	169 mg.	de F —
— pour les poils	7 mg.,	2 de F —

Pour les dents et les poils, ces chiffres sont de l'ordre de grandeur de ceux déterminés, pour l'homme et pour quelques espèces animales, par A. GAUTIER et P. CLAUSMANN [47]. Pour l'os, il est notablement inférieur, puisque A. GAUTIER indique, chez l'homme, un taux moyen de 30 mg. dans les os longs, et, chez le bœuf, un taux de 60 mg. pour 100 g. Ces différences de teneur s'expliquent par la différence de texture intime constatée dans les diverses espèces.

Au moment de commencer des intoxications chroniques, nous nous sommes demandée quelle était, pour le lapin, la dose à donner pour réaliser des fluoroses.

Les auteurs donnent à ce sujet des chiffres très variables et qui, généralement, se rapportent à des intoxications par voie buccale, où la dose ingérée réellement n'est pas aussi rigoureuse que celle absorbée par voie sous-cutanée. Aussi,

avons-nous réalisé primitivement deux essais sur des lapins *A* et *B* : le premier recevait quotidiennement une dose de fluor 5 fois plus élevée que le second.

Nous allons donner le détail de ces essais :

Lapin B.

Un lapin mâle, pesant 2 kg., 650, fut mis en expérience du 20 février au 15 juin, et reçut journellement une dose de fluorure de sodium de 2 mg., 21 (correspondant à 1 mg. de F.).

Ces doses furent administrées sous forme de solution aqueuse conservée en ampoules stériles. Ainsi les accidents susceptibles de se produire après l'injection d'une solution non stérilisée étaient éliminés. Le pH de la solution fut, avant la mise en ampoules, amené à 6,2 par acidification légère à l'acide chlorhydrique dilué. Cette précaution avait pour but d'éviter les escarres qui peuvent résulter des injections répétées de solutions alcalines ou neutres.

Le lapin *B* reçut ainsi, chaque jour, pendant près de quatre mois, 2 cm³ de solution diluée de fluorure, soit, en tout, environ 220 mg. de fluorure de sodium.

Il ne manifesta, au cours du traitement, aucun symptôme visible d'intoxication. Son appétit fut conservé et son poids augmenta normalement, ainsi que le montre le tableau suivant :

LAPIN B

DATES	POIDS
20 janvier	2 kg., 650
11 février	2 kg., 620
1 ^{er} mars	2 kg., 800
15 mars	2 kg., 820
27 avril	2 kg., 770
10 mai	2 kg., 810

Il ne semble pas qu'on puisse, à des doses aussi minimales, réaliser une véritable fluorose.

Nous avons jugé inutile de sacrifier l'animal, étant donné les faibles quantités de fluor retrouvées dans les organes du lapin *A*, qui avait reçu des doses quotidiennes 5 fois plus grandes que celles de *B* pendant le même temps.

Lapin *A*.

Un lapin mâle, pesant 3 kg., 420, fut mis en expérience le 20 février, parallèlement au lapin *B*, mais reçut quotidiennement une dose de fluorure 5 fois supérieure à celle de *B*, soit 11 mg. de fluorure de sodium (correspondant à 5 mg. de F). Cette quantité était contenue dans 1 cm³ d'eau distillée, en solution stérile, de même pH : 6,2. La solution injectée à *A* était donc dix fois plus concentrée que celle injectée à *B*.

Dans ces conditions, nous avons constaté rapidement chez *A* des escarres à l'endroit de l'injection pendant les 3 mois 1/2 que dura l'expérience. Ces escarres commençaient par des indurations ; après la chute des poils à l'endroit de l'injection, on constatait la présence de plaies qui évoluaient d'ailleurs toutes vers la guérison.

Étant donné les précautions prises quant à la préparation des solutions injectées, on peut en déduire que le fluorure de sodium, dès qu'il est en solution un peu concentrée, donne lieu à des ulcérations locales par injection sous-cutanée. Cette opinion est conforme à celle de L. GOLDBERG [52] qui, dans une étude sur l'action biologique du fluor, a signalé la nécrose locale due à l'injection de solutions de fluorures.

En dehors de ces affections localisées, le lapin *A* se nourrit normalement et son poids évolua de la façon suivante :

LAPIN A

DATES	POIDS
20 janvier	3 kg., 420
11 février	3 kg., 390
1 ^{er} mars	3 kg., 540
15 mars	3 kg., 550
27 avril	2 kg., 980
10 mai	2 kg., 800

Au bout de 3 mois donc, il commençait à maigrir. De plus, depuis le début de mai, il manifesta une raideur très caractéristique de la colonne vertébrale, qui alla en s'accroissant.

Vers le 4 juin, l'animal semblait en pleine « période larvée », telle que l'a décrite H. CRISTIANI [25] chez les animaux vivant au voisinage des usines à aluminium. Il nous a paru intéressant de voir si, dès cette période de l'intoxication, il y avait fixation de fluor dans l'organisme.

On sacrifia l'animal par saignée au cœur. On put ainsi recueillir un volume de sang de près de 50 cm³, et séparer globules et plasma.

A l'autopsie, on constata que l'animal portait, sur le côté gauche, une grosse tumeur s'étendant de la face dorsale à la face ventrale, et pesant 44 g.

Cette tumeur était sous-cutanée et renfermait, dans une poche vascularisée, un produit épais, blanchâtre, crémeux, mal lié. Ventralement, la poche était arrondie ; dorsalement, elle était irrégulière et aplatie.

La boîte crânienne contenait un liquide séro-hémorragique.

Nous avons prélevé les organes habituels.

Le cerveau a été isolé du cervelet et du bulbe.

De plus, nous avons prélevé un fémur, dont nous avons séparé la moelle.

Nous avons effectué le dosage du fluor dans les tissus ainsi séparés.

Tous les résultats obtenus sont consignés dans le tableau ci après :

RÉPARTITION DU FLUOR DANS LES ORGANES D'UN LAPIN DE
2 KG., 800 SOUMIS A UNE INTOXICATION CHRONIQUE PAR
INJECTION SOUS-CUTANÉE JOURNALIÈRE DE
11 MG. DE FNa PENDANT 4 MOIS

ORGANES OU TISSUS PRELEVES	POIDS DE L'ORGANE OU DE LA PRISE D'ESSAI (en g.)	FLUOR TROUVÉ (en mg.)	F EN MG. POUR 100 G. D'ORGANES
Foie	80	0,42	0,52
Reins	18	0,10	0,55
Poumons	17	0,025	0,29
Cœur	4	0,05	1,25
Muscle : Quadriceps fémoral	48	0,10	0,21
Cerveau	7	0,03	0,42
Bulbe	1,472	0,01	0,67
Cervelet	1,753	0,02	1,14
Moelle osseuse	1,360	0	—
Os	9	3	33,3
Dents	0,272	0,67	246,5
Poils	5	0,55	11
Testicules	6	0,02	0,33
Pancréas	1,051	0,035	3,33
Thyroïdes	0,110	0	—
Parathyroïdes	0,011	0	—
Surrénales	0,639	0,01	1,56
Hypophyse	0,024	0,02	82,3
Rate	0,851	0,05	5,87
Bile	IV gouttes	0,02	8 envir.
Tumeur	44	0,07	0,15
Fèces	4	0,14	3,15
Urine	49	0,49	1
Globules	20	0,10	0,50
Plasma (hémolysé) ..	20	0,28	1,40
Sang total	20	0,19	0,95

Si nous examinons ces résultats, nous constatons que la teneur du sang total est très voisine du taux normal, mais — fait très intéressant — nous retrouvons ici une répartition érythro-plasmatique encore nettement en faveur du plasma, dont le taux en fluor est environ trois fois celui mis en évidence dans les globules. Ce fait, retrouvé dans l'intoxi-

cation chronique, montre clairement l'électivité du fluor pour le plasma.

Dans les viscères — foie, reins, poumons, cœur — les quantités dosées sont nettement plus faibles que celles constatées dans l'intoxication aiguë ; ceci, d'ailleurs, est tout à fait normal.

Si nous considérons l'ensemble de l'encéphale, nous retrouvons beaucoup plus de fluor dans le cervelet que dans le bulbe et, dans le bulbe, plus que dans le cerveau.

Ceci s'oppose à ce qu'on trouve habituellement pour le fluor normal, A. GAUTIER [48] ayant noté la teneur prépondérante du bulbe par rapport à l'ensemble de l'encéphale.

Les taux de fluor dosés dans la rate et le pancréas sont, là encore, nettement plus élevés que ceux contenus dans les autres viscères.

Dans les glandes endocrines, si nous n'en retrouvons pas dans les thyroïdes, ni dans les parathyroïdes, nous en relevons un pourcentage important dans l'hypophyse.

Nous avons dosé le fluor dans la tumeur prélevée à l'autopsie de l'animal, mais nous n'en avons retrouvé qu'une quantité très faible : 0 mg., 07 pour l'ensemble de cette tumeur.

Si nous observons les chiffres obtenus pour la bile, les fèces, l'urine, nous notons qu'une partie du fluor injecté s'élimine par ces voies. Enfin, si nous considérons la dose totale injectée — 5 mg. de F par jour, soit, en tout, environ 1 g., — nous voyons que les résultats précédents n'indiquent aucune localisation élective du fluor pour un viscère.

Par contre, les taux trouvés dans les os et les phanères indiquent une augmentation assez considérable du fluor ; ainsi, pour l'os, la teneur est trois fois plus élevée que celle trouvée chez le lapin normal ; pour les dents et les poils, elle est environ une fois et demie celle des mêmes tissus prélevés sur un lapin non fluoré.

Cette quantité importante de fluor décelée dans les os et les phanères, après intoxication chronique, est en concordance avec l'opinion des auteurs qui ont observé les accidents dus à la fluorose.

Rappelons qu'ils avaient noté, outre l'ostéomalacie, des altérations des dents connues sous le nom d'émail tacheté.

Nous avons voulu contrôler ces résultats et, afin d'obtenir dans les autres organes des taux de fluor notablement plus élevés que la teneur trouvée normalement chez les mêmes animaux, nous avons fait une série d'expériences en administrant à des lapins des doses nettement supérieures à celles qu'avait reçu le lapin A.

Lapin D.

Un lapin mâle, pesant 2 kg., 965, fut soumis à une intoxication semi-chronique dans les conditions suivantes :

Les 27, 28, 29 et 30 avril, il reçut quotidiennement 0 g., 25 de fluorure de sodium en solution saturée par voie sous-cutanée. Le 1^{er} mai, cette dose fut doublée.

Le 2 mai au matin, l'animal a été trouvé mort dans la cage. Nous n'avons donc pas pu observer les symptômes qui ont précédé la mort.

Le lapin avait reçu, en tout, 1 g., 50 de fluorure de sodium correspondant à 0 g., 67 de fluor.

Cette dose, répartie sur cinq jours, est faible par rapport à celle qu'il nous avait fallu administrer au lapin C pour provoquer une intoxication aiguë. Ceci confirme ce que nous avons pensé : que les 2 g., 50 nécessaires dans ce cas ne correspondent pas du tout à la dose minima mortelle, la plus grande partie de la solution n'ayant pas été résorbée.

Au contraire, pour le lapin D, la dose administrée chaque jour pouvait être résorbée au moment de l'injection suivante, et efficacement utilisée.

L'action toxique s'était d'ailleurs manifestée rapidement puisque, au 2 mai, le poids de l'animal était tombé à 2 k., 690, soit une diminution de 10 p. 100 environ au cours de l'intoxication.

A l'autopsie, le lapin, très raide et très contracté, avait la vessie pleine — fait que nous avons retrouvé pour toutes les intoxications par le fluor, montrant l'action de cet élément, sur la contraction des sphincters. Les organes paraissaient normaux ; toutefois, nous avons noté une pigmentation exagérée des surrénales.

Au cours de l'intoxication, l'animal avait été placé dans une cage à double fond, de façon à recueillir l'urine totale éliminée. Nous en avons ainsi obtenu 760 cm³ et, après évaporation, nous y avons dosé le fluor, comme dans les organes.

Le dosage nous donna les résultats suivants :

RÉPARTITION DU FLUOR DANS LES ORGANES D'UN LAPIN DE 2 KG., 690 AYANT SUCCOMBÉ A UNE INTOXICATION CHRONIQUE AU MOYEN D'INJECTIONS SOUS-CUTANÉES DE 1 G., 50 DE FNa (EN 6 JOURS)

ORGANES OU TISSUS PRÉLEVÉS	POIDS DE L'ORGANE OU DE LA PRISE D'ESSAI (en g.)	FLUOR TROUVÉ (en mg.)	F EN MG. POUR 100 G. D'ORGANES
Foie	90	1,62	1,80
Reins	27	0,36	1,3
Poumons	19	0,42	2,21
Cœur	13,5	0,06	0,44
Muscle : Quadriceps fémoral	27	0,34	1,25
Encéphale	9,373	0,035	0,37
Moelle osseuse	1,465	0,03	2,05
Os	11,5	5,2	45,2
Dents	0,339	0,70	206,5
Poils	6	0,52	8,66
Testicules	10	0,13	1,3
Pancréas	1,165	0,14	12
Thyroïdes	0,192	0,035	18,2
Parathyroïdes	0,035	0	—
Surrénales	1,114	0,03	2,69
Hypophyse	0,008	0,02	250
Rate	1,236	0,03	2,4
Sang	1,29	0,04	2,9
Bile	3,50	0,14	4
Urine totale	760	9,6	1,26

L'examen des résultats trouvés pour le lapin *D* montre que le taux de fluor dans les viscères — foie, reins, poumons, cœur — est notablement plus élevé que celui obtenu pour le lapin *A*, la teneur se rapprochant nettement de celle notée pour le lapin *C*, ayant succombé à une intoxication aiguë après injection sous-cutanée de fluorure de sodium.

Parmi les glandes endocrines, l'hypophyse est toujours remarquablement riche.

L'élimination du toxique se fait partiellement par la bile, les fèces et l'urine ; mais surtout, fait important, c'est dans les os et les phanères que s'accumule le fluor. Dans l'os, en effet, le taux de 45 mg., 2 pour 100 g. est environ quatre fois supérieur à la teneur de l'os normal. Nous retrouvons là plus de fluor que dans les os du lapin *A* soumis à une intoxication très lente. En revanche, dans les dents et les poils, le taux est nettement plus faible pour le lapin *D*.

Nous avons voulu contrôler ces résultats et vérifier que le lapin *D* n'avait pas succombé à une affection intercurrente, et que 1 g., 50 de fluorure de sodium administré en cinq jours était capable de provoquer la mort.

Lapin E.

Un autre lapin mâle, pesant 2 kg., 680, fut soumis au même traitement que le lapin *D*, et reçut, par injection sous-cutanée, 0 g., 25 de FNa tous les jours, du 1^{er} au 6 mai. Il mourut le 7 au matin, ayant reçu aussi 1 g., 50 de fluorure. Il ne pesait plus que 2 kg., 400. Son poids avait donc diminué de près de 10 p. 100 au cours de l'intoxication.

Il est intéressant de constater la similitude de ces deux intoxications : l'animal mourut dans les deux cas après avoir reçu la même dose de fluorure de sodium, par la même voie.

Les signes, à l'autopsie : raideur, contraction, vessie pleine, furent les mêmes que ceux déjà observés pour les lapins *D* et *C*.

Le dosage du fluor a donné les résultats suivants :

RÉPARTITION DU FLUOR DANS LES ORGANES D'UN LAPIN DE
2 KG., 400 AYANT SUCCOMBÉ APRÈS AVOIR REÇU PAR VOIE
SOUS-CUTANÉE, 6 INJECTIONS JOURNALIÈRES
DE FNa DE 0 G., 25 CHACUNE.

ORGANES, OU TISSUS PRELEVES	POIDS DE L'ORGANE OU DE LA PRISE D'ESSAI (en g.)	FLUOR TROUVÉ (en mg.)	F EN MG. POUR 100 G. D'ORGANES
Foie	70	1,09	1,55
Reins	20	0,26	1,3
Poumons	11	0,34	3,09
Cœur	6	0,15	2,5
Muscle : Quadriceps fémoral	28	0,275	0,98
Encéphale	9,153	0,035	0,38
Moelle osseuse	0,740	0,065	8,7
Os	9	3,6	40
Dents	0,578	1,10	190,3
Poils	0,174	0,46	9,2
Testicules	6,5	0,05	0,76
Pancréas	2,04	0,035	1,71
Thyroïdes	0,174	0,06	34,4
Surrénales	0,544	0	—
Hypophyse	0,021	0,03	142
Bile	IV gouttes	0,03	12 envir.
Sang	11	0,21	3,5
Urine	800	10,4	1,3

L'examen de ce tableau nous montre la parfaite similitude des résultats obtenus pour les lapins *D* et *E* : même teneur très élevée pour les os, même augmentation du taux de fluor dans les poils et les dents.

La présence de fluor dans la moelle osseuse de *D* et de *E*, semble indiquer chez ces animaux un simple passage du fluor allant se fixer sur le tissu osseux. En effet, chez le lapin *A* qui avait reçu des doses très faibles, la moelle osseuse ne renfermait pas de fluor, alors que l'os en contenait des quantités notables.

Nous avons mis en évidence, par ces essais, la localisation du fluor dans l'organisme à la suite d'intoxications. Mais nous n'avons pas voulu terminer notre étude sans réaliser des accidents typiques de fluorose aiguë. Pour cela, nous avons administré à un lapin des doses quotidiennes de fluorure de sodium intermédiaires entre celles données au lapin *A* et celles qu'ont reçues les lapins *D* et *E*.

Lapin F.

Un lapin mâle, pesant 2 kg., 060, reçut du fluorure de sodium en injection sous-cutanée à la dose quotidienne de 0 g., 10, en solution saturée, à partir du 7 mai.

L'animal manifesta de la raideur de la colonne vertébrale au bout de quelques jours, et commença à maigrir ; le 16 mai, il ne pesait plus que 2 kg., 010 : le 26 mai : 1 kg., 890 ; le 6 juin : 1 kg., 650.

Le 9 juin, ayant reçu 3 g., 30 de fluorure de sodium, le lapin *F* mourut. Son poids à cette date était de 1 kg., 490 ; il avait donc diminué progressivement de près de 14 p. 100 pendant les 33 jours qu'avait duré l'intoxication.

Or, cet animal était jeune, et aurait dû normalement avoir une augmentation de poids régulière. Ce retard de l'accroissement pondéral des animaux fluorés a été signalé par L. GOLDEMBERG [52] lors de ses expériences.

Nous avons noté, en outre, une cachexie profonde : le lapin, immobile dans un coin de sa cage, touchait à peine aux aliments.

À partir du 5 juin, nous avons prévu la mort prochaine de l'animal. Son état de maigreur s'accroissant, sa peau était littéralement collée à ses os, de telle sorte qu'il devenait malaisé de faire les injections sous-cutanées.

Les derniers jours le lapin ne mangeait plus et sa vitalité était considérablement diminuée.

Ces symptômes sont tout à fait en harmonie avec ceux relevés par les auteurs ayant observé des cas d'intoxications chroniques par le fluor.

III

Interprétation des résultats

En résumé, ces études de toxicologie expérimentale nous ont montré, dans tous les cas, certains caractères que nous rappellerons brièvement ici :

1° Nous avons toujours noté, à l'autopsie des animaux intoxiqués, un état de contraction musculaire se manifestant particulièrement au niveau des sphincters. Cette contraction musculaire était particulièrement nette dans les intoxications aiguës, où l'estomac lui-même était dur (éclatant par places dans le cas de l'intoxication par injection intra-veineuse).

L. GOLDEMBERG [52], en étudiant expérimentalement l'action biologique du fluor, avait signalé un relâchement des sphincters. Ceci est en complète opposition avec ce que nous avons toujours constaté.

2° Le taux de fluor trouvé dans les viscères n'indique pas de localisation élective marquée pour l'un quelconque d'entre eux.

3° Le dosage du fluor dans le sang est particulièrement intéressant, et a montré que la répartition érythro-plasmatique était très nettement en faveur du plasma, tant dans l'intoxication aiguë que dans l'intoxication chronique.

4° La localisation dans les glandes endocrines nous a permis de constater que nous retrouvions généralement du

fluor dans ces organes à des taux relativement élevés, surtout si l'on considère l'hypophyse.

H. CRISTIANI [28] avait, du reste, noté des lésions histopathologiques de l'hypophyse dans la fluorose.

Le même auteur avait également noté [26] des altérations de la glande thyroïde, et L. GOLDEMBERG [53] admet une interaction entre le fluor et l'hyperthyroïdisme.

5° De plus nous avons vérifié que la localisation élective du fluor se faisait dans les os et les phanères. Nous avons, dans toutes les intoxications chroniques, une augmentation très notable du taux du fluor dans ces tissus.

6° Enfin, il y a *élimination* du fluor par les excréta, mais en proportions faibles. Les urines ont décelé des quantités de fluor de l'ordre de 1 mg. pour 100 cm³, et la présence de cet élément dans la bile, donc dans les fèces, est constante chez les animaux intoxiqués.

D'ailleurs, la faible élimination s'explique par l'*accumulation* certaine du fluor dans l'organisme : en effet, nous avons constaté qu'une dose de 0 g., 25 de fluorure de sodium administrée par voie sous-cutanée aux lapins *D* et *E*, n'était pas mortelle ; cependant le fluor s'était accumulé chez ces animaux en quantité suffisante pour provoquer leur mort après qu'ils eurent reçu six jours de suite la même quantité de toxique.

Cette accumulation dans l'organisme peut paraître surprenante quand on songe à la petite molécule qu'est le fluor. Il faut en voir l'explication dans l'affinité qu'a le calcium pour le fluor. Celui-ci fixé et insolubilisé à l'état de fluorure de calcium dans les tissus de l'organisme — os, phanères — les plus riches en calcium.

CONCLUSIONS

Nous avons tenté d'apporter une contribution à l'étude de la toxicologie du fluor.

L'action nocive de ce métalloïde, à l'état d'acide fluorhydrique, de fluorure ou de fluosilicate a été mise en évidence au cours de ces dernières années par de nombreux auteurs, qui ont signalé les effets toxiques de doses, même faibles, de fluor, si l'absorption en est répétée.

Nous avons voulu mettre au point une technique de dosage susceptible d'être appliquée à la recherche toxicologique de cet élément.

Dans ce but, nous avons étudié un procédé de dosage par spectrophotométrie. Ce procédé — qui donne de bons résultats pour doser le fluor lorsqu'il n'est pas en présence de substances étrangères — s'est révélé inapplicable en présence d'autres éléments que le fluor, et nous avons dû y renoncer pour l'analyse toxicologique.

Nous avons alors essayé et mis au point successivement deux techniques colorimétriques : l'une, basée sur une réaction colorée du fluor avec le chlorure ferrique et l'acétyl-acétone ; l'autre, basée sur une réaction colorée du fluor avec le mélange de nitrate de zirconium et d'alizarine-sulfonate de sodium.

Les deux nous ont donné de bons résultats. La seconde est toutefois plus simple et a l'avantage sur la première d'être encore praticable en présence de faibles quantités

d'acide chlorhydrique. Nous l'avons préférée et utilisée pour doser le fluor, après l'avoir isolé par volatilisation à l'état d'acide hydrofluosilicique. La sensibilité de la méthode colorimétrique est de l'ordre du 1/100 de mg.

Au point de vue de l'extraction du fluor des milieux organiques, nous avons préféré un procédé physique d'isolement, à la destruction classique qui a l'inconvénient d'introduire une grande quantité d'acides, plus ou moins gênante pour la suite des dosages. Dans ce but, nous avons essayé l'ultrafiltration ; cette technique ne nous a pas donné satisfaction dans les conditions où nous nous étions placée et nous avons eu recours à l'électrodialyse, qui nous a donné d'excellents résultats.

Notre méthode d'ensemble pour le dosage du fluor dans les milieux biologiques en toxicologie se résume ainsi à trois opérations : une électrodialyse pour séparer la matière organique, une distillation pour isoler le fluor des autres éléments minéraux, un dosage colorimétrique pour l'évaluer.

Nous avons appliqué cette technique au dosage du fluor dans les organes de divers animaux, après intoxication par le fluorure de sodium.

Ces essais nous ont permis de vérifier que notre méthode était appropriée à l'analyse toxicologique. De plus, la répartition du fluor dans les divers organes nous a montré que cet élément s'accumule dans les os et les phanères. Cette constatation est en accord avec ce qu'ont écrit les divers auteurs qui ont dosé le fluor dans le tissu osseux. Dans une intoxication chronique, en dehors des os, dents, poils, etc., on ne le retrouve qu'à des teneurs minimales dans tous les autres organes.

L'accumulation caractéristique dans les os et les phanères s'explique par la fixation et l'insolubilisation du fluor par le calcium de ces tissus.

Enfin, l'accumulation justifie une faible élimination par les excréments, ainsi que nous l'avons constaté pour l'urine dont la teneur moyenne en fluor est, chez les animaux intoxiqués de 1 mg. pour 100 cm³.

Au point de vue de la répartition érythro-plâsmatique, quelques essais nous ont montré qu'elle était, pour le fluor, favorable au plasma.

Quant à la teneur des glandes endocrines, nous devons signaler que nous avons retrouvé le fluor constamment dans l'hypophyse, souvent dans les surrénales, rarement dans les thyroïdes, jamais dans les parathyroïdes.

Vu, bon à imprimer :
Le Président de la Thèse,
E. TASSILLY

Vu :
Le Doyen de la Faculté,
Paul GUERIN

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLETY

BIBLIOGRAPHIE

1. ADOLPH (W.-H.) und DRAWE (P.). — Fluoranalysen. (*Zeit. angew. Chem.*, 1912, **25**, 1371-1372.)
2. AMY (L.). — Contribution à l'étude des propriétés et de la structure des solutions et des gelées de gomme. (*Thèse Doct. ès-Sc. phys.*, Paris, 1934.)
3. ARMSTRONG (W.-D.). — Colorimetric determination of Fluorine. (*Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 1933, **5**, 300-302.)
4. ARMSTRONG (W.-D.). — Silicon tetrafluoride volatilization. (*Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 1933, **5**, 315-317.)
5. BALTHAZARD (V.) et CONDREA (P.). — Obtention rapide de méthémoglobine pure et stable. (*Annales de Médecine légale*, 1926, **6**, 320-324.)
6. BALTHAZARD (V.) et PHILIPPE (M.). — La cyanméthémoglobine. Dosage cyanhymétrique de la méthémoglobine. (*Annales de Médecine légale*, 1926, **6**, 137-143.)
7. BAYLE (E.) et AMY (L.). — Sur le dosage de l'anion silicifluorhydrique (fluosilicique) et celui du fluor en général. (*C. R. Ac. Sc.*, 1929, **188**, 792-794.)
8. BEIN (S.). — Eine Methode zur indirecten Fluorbestimmung. (*Z. Anal. Chem.*, 1887, **26**, 733-736.)

9. BERGARA (C.) — Altérations dentaires et osseuses dans l'intoxication chronique par les fluorures. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, 600.)
10. BERZÉLIUS (J.-J.). — Traité de Chimie (*Edition Française*, 1823, **7**, 472.)
11. BOËR (J.-H. de). — Empfindliche Farbreaktionen auf Zirkonium, Hafnium und Fluor mittels oxyanthrachinonen. (*Rec. Trav. Chim. des Pays-Bas*, 1925, **44**, 1071-1076.)
12. BOËR (J.-H. de) und BASART (J.). — *Eine schnelle massanalytische Bestimmung des Fluors auch in komplexen und unlöslichen Fluoriden. (*Z. anorg. Chem.*, 1926, **152**, 213-220.)
13. BORUFF (C.-S.) and ABBOTT (G.-B.). — Détermination of fluorides in Illinois waters. (*Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 1933, **5**, 236-238.)
14. BRANDL (J.) und TAPPEINER (H.). — Ueber die Ablagerung von Fluorverbindungen im Organismus nach Fütterung mit Fluornatrium. (*Zeitschr. f. Biol.*, 1891, **28**, 518-539.)
15. BROWNING (P.-E.). — A modified procedure for the detection of silicates, fluorides and fluosilicates. (*Am. J. Sci.*, 1911, **32**, 249-250.)
16. CARNOT (A.). — Sur le dosage du fluor. (*C. R. Ac. Sc.*, 1892, **114**, 750.)
17. CARNOT (A.). — Recherches sur la composition générale et la teneur en fluor des os modernes et des os fossiles des différents âges. (*Annales des Mines*, 1893, **3**, 155-196.)
18. CHANELES (J.). — Effets de la fluorose chronique sur les dents des rats blancs et action des rayons ultraviolets. (*C. R. Soc. Biol.*, 1929, **102**, 860.)
19. CHANELES (J.). — Alteraciones generales y dentarias producidas por el fluor en la rata blanca. La radiacion ultravioleta en la fluorosis experimental. (*Rev. Soc. Argent. Biol.*, 1929, **5**, 317-335.)
20. CHANG (C.-Y.), PHILIPS (P.-H.) and HART (E.-B.). — [*J. Dairy Sci.*, 1934, **17**, 695-700]. Cité d'après : L'influence des phosphates bruts administrés dans la ration alimentaire sur la teneur en fluor des organes et des tissus des vaches laitières. (*Chim. et Ind.*, 1935, **33**, 978.)

21. CHARONNAT (R.) et ROCHE (Mlle S.). — Le fluor des eaux minérales françaises. (*C. R. Ac. Sc.*, 1931, **199**, 1325.)
22. CHURCHILL (H.-V.). — Occurrence of Fluorides in some waters of the United States. (*Ind., and. Eng. Chem.*, 1931, **23**, 996-998.)
23. COBENZL (A.). — Kieselfluorsalze. (*Chemiker Zeitung*, 1921, **45**, 1116.)
24. CRISTIANI (H.). — Existe-t-il chez l'homme une fluorose ou cachexie fluorique ? (*Presse Méd.*, Juillet 1926, 833-834.)
25. CRISTIANI (H.). — La période larvée de l'intoxication fluorique. (*C. R. Soc. Biol.*, 1930, **103**, 292.)
26. CRISTIANI (H.). Altération de la glande thyroïde dans l'intoxication fluorée. (*C. R. Soc. Biol.*, 1930, **103**, 554.) 912-917.)
27. CRISTIANI (H.). — Fluor et acide fluorhydrique. (*Bull. Intern. du Travail, Hygiène du travail*, Genève 1930, 912-917.)
28. CRISTIANI (H.). — Lésions histo-pathologique de l'hypophyse dans la fluorose. (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, **107**, 554.)
29. CRISTIANI (H.) et CHAUSSE (P.). — Quantités quotidiennes minima de fluorure de sodium capables de produire la cachexie fluorique. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, **96**, 842.)
30. CRISTIANI (H.) et CHAUSSE (P.). — Nouvelles observations sur l'intoxication chronique par de très petites doses de fluosilicate de sodium. (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, **96**, 843.)
31. CRISTIANI (H.) et GAUTIER (R.). — Emanations fluorées des usines. Etude expérimentale de l'action du fluor sur les végétaux. (*Annales Hyg. publ. ind. et soc.*, Paris, 1925, **3**, 49-64.)
32. CRISTIANI (H.) et GAUTIER (R.). — Le fluor au point de vue de l'hygiène industrielle. Action du fluor sur les animaux. (*Annales Hyg. publ. ind. et soc.*, Paris, 1925, **3**, 210-233.)
33. CRISTIANI (H.) et GAUTIER (R.). — Intoxication chronique d'origine alimentaire par le fluor. (*C. R. Soc. Biol.*, 1925, **92**, 139.)

34. CRISTIANI (H.) et GAUTIER (R.). — La cachexie fluorique expérimentale : effets chroniques de petites doses de fluosilicate de soude. (*C. R. Soc. Biol.*, 1925, **92**, 946.)
35. CRISTIANI (H.) et GAUTIER (R.). — Action des fluorures alcalins sur les animaux. (*C. R. Soc. Biol.*, 1925, **92**, 1276.)
36. CRISTIANI (H.) et GAUTIER (R.). — La fluorose ou la cachexie fluorique. (*Presse Méd.*, avril 1926, 469-470.)
37. DERRIEN (E.). — Sur la méthémoglobine. (*Thèse Doct. Pharm.*, Montpellier, 1906.)
38. DIÉRE (Ch.). — La dialyse électrique (ou électrodialyse) en biochimie. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1926, **8**, 144-159.)
39. DIDIER (Mme H.). — Intoxication expérimentale par le fluosilicate chez le chien et recherche du fluor dans les organes. (*Thèse Doct. Pharm.*, Bordeaux, 1932.)
40. ELFORD (W.-J.). — Series of graded collodion membranes suitable for general bacteriological use, especially in filterable virus studies. (*Journ. Pathol. and Bacter.*, 1931, **34**, 505-521.)
41. FABRE (R.) et BAZILLE (Mlle S.). — Sur la méthémoglobine fluorée. Application de son étude spectrophotométrique à la recherche de la méthémoglobine et au dosage des fluorures. (*Journ. Pharm. et Chim.*, 1933, **18**, 465.)
42. FAIRCHILD (J.-G.). — Volumetric determination of fluorine by the use of ferric chloride. (*J. Wash. Acad. Sci.*, 1930, **20**, 141-146.)
43. FLATT (R.). — Sur le dosage micropotentiométrique du fluor. (*Bull. Soc. Chim.*, 1934 (5), **1**, 174.)
44. FORBES (E.-B.), HUNT (C.-H.), SCHULZ (J.-A.) and WINTER (A.-R.). — The utilization of calcium compounds in animal nutrition. (*Ohio Agric. exp. Station Bull.*, 1921, **347**, 69.)
45. FORBES (E.-B.) and SCHULTZ (J.-A.). — The utilization of calcium compounds in animal nutrition. (*Ohio Agric. exp. Station Bull.*, 1921, **347**, 60.)
46. FOSTER (M.-D.). — Colorimetric determination of Fluoride in water using Ferric chloride. (*Ind. Eng. Chem., Anal., Ed.* 1933, **5**, 234-236.)

47. FRÈRE (F.-J.). — Determination of Fluorine in cryolite. (*Ind. Eng. Chem.*, 1933, **5**, 17-18.)
48. GAUTIER (A.) et CLAUSMANN (P.). — Recherche et dosage des plus faibles quantités de fluor dans les eaux, les minerais et les tissus vivants. (*Bull. Soc. Chim.*, 1912, **11**, 872-884.)
49. GAUTIER (A.) et CLAUSMANN (P.). — Le fluor dans l'organisme animal. (*Bull. Soc. Chim., Mémoires*, 1913, **13**, 909-924.)
50. GAUTIER (A.) et CLAUSMANN (P.). — Le Fluor dans le règne végétal. (*C. R. Ac. Sc.*, 1916, **162**, 105-112.)
51. GAY-LUSSAC (J.) et BERTHOLLET (C.). — Lettre de M. GAY-LUSSAC à M. BERTHOLLET sur la présence de l'acide fluorique dans les substances animales, et sur la pierre alumineuse de la Tolfa. (*Ann. de Chimie*, 1805, **55**, 258.)
52. GOLDEMBERG (L.). — Action biologique du fluor. (*Journal de Physiol. et de Path. Gén.*, 1927, **25**, 65-72.)
53. GOLDEMBERG (L.). — Buenos-Ayres. A propos du traitement de la maladie de Basedow et de l'hyperthyroïdisme par le fluor. (*Bruxelles-Médical*, mars 1935, **15**, 519-526.)
54. GRABAR (P.) et WEILL (J.). — Contribution à l'étude de l'ultrafiltration des liquides organiques. Technique et appareillage. (*C. R. Soc. Biol.*, 1930, **104**, 398-401.)
55. GRABAR (P.). — Sur la possibilité de séparer des colloïdes par passage à travers des membranes de porosité déterminée. (*C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, 67.)
56. GRABAR (P.). — Appareil pour ultrafiltration sous pression. (*C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, 70.)
57. GREEFF (A.). — Titrimetrische Bestimmung des Fluors. (*Ber. Chem. Ges.*, 1913, **46**, 2511-2513.)
58. GUYOT (P.). — Dosage volumétrique des fluorures solubles (*C. R. Ac. Sc.*, 1870, **71**, 274-275.)

GUYOT (P.). — Dosage de l'acide fluorhydrique libre. (*C. R. Ac. Sc.*, 1871, **73**, 273-274.)
59. HART (E.-B.), STEENBOCK (H.) and MORRISON (F.-B.). — (*Wisconsin Agric. exp. Station Bull.*, 1927, **6**, 390.) [Cité par H. VELU, *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, 635.)

60. HILEMAN (A.). — Die Abscheidung und alkalimetrische Bestimmung von Siliciumfluorid bei der Analyse von Fluoriden (*Z. Anorg. Chem.*, 1906, **51**, 158-170.)
61. JACOB (K.-D.) and REYNOLDS (D.-S.). — The Fluorine content of Phosphate rock. (*J. Assoc. Official Agr. Chem.*, 1928, **11**, 237-250.)
62. JODLBAUER (A.). — Über den Fluorgehalt der Knochen und Zähne. (*Zeitsch. f. Biolog.*, 1903, **44**, 259-267.)
63. KORENMANN (I.-M.). — Über die Bestimmung der Fluoride. (*J. Prikl. Khim.*, 1933, **6**, 986-987.)
64. LABAT (J.-A.). — Nouveaux empoisonnements par le fluosilicate de sodium. (*Bull. Soc. Pharm. de Bordeaux*, 1931, 239.)
65. LASNE (H.). — Dosage du fluor dans les substances décomposables par l'acide sulfurique et, en particulier, dans les phosphates naturels. (*Bull. Soc. Chim.*, 1888, **50**, 167-170.)
66. LÜNING (O.). — Verwendung von silicofluoriden zu Vergiftungszwecken. (*Chemiker Zeitung*, 1922, **46**, 73.)
67. MAC CLURE (F.-J.) and MITCHELL (H.-H.). — The effect of fluorine on the calcium metabolism of albino rats and the composition of the bones. (*Journ. Biol. Chem.*, 1931, **90**, 297-320.)
68. MAC CLURE (F.-J.) and MITCHELL (H.-H.). — Effect of calcium fluoride and phosphate rock on the calcium retention of young growing pigs. (*J. Agr. Research*, 1931, **42**, 363-373.)
69. MERWIN (H.-E.). — Coloration in peroxidized Titanium solutions, with special reference to the colorimetric methods of estimating Titanium and Fluorine. (*Am. J. Sc.*, 1909, **28**, 119-125.)
70. MOLLER (P.-F.) und GUDJONSSON (S.-V.). — (*Arbeitsschutz*, 1933, **12**, 265-269.) Cité d'après : La fluorose chez des ouvriers manipulant de la cryolithe. (*Chim. et Ind.*, 1934, **31**, 1338.)

71. MORSE (H.-W.) und PIERCE (G.-W.). — Diffusion und Übersättigung in Gelatine (*Zeit. Phys. Chem.*, 1903, **45**, 589-607.)
72. MOUGNAUD (P.). — Etude critique du dosage du fluor. (*Thèse Doct. Pharm.*, Paris, 1931.)
73. NICLOUX (M.). et FONTÈS (G.). — Sur quelques modes de formation de la méthémoglobine et sur son dosage. (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1924, **6**, 728.)
74. OFFERMANN (H.). — Quantitative Bestimmung des Fluors. (*Zeit. Angew. Chem.*, 1890, **3**, 615-618.)
75. PASCAL. — Traité de Chimie minérale, 12 vol., grand in-8°, Paris, Masson, 1931, **5**, 398. (*Silicium*, par M. SAMSOEN.)
76. PENFIELD (S.-L.). — On a new volumetric method of determining fluorine. (*Chem. News*, 1879, **39**, 179-181.)
77. PEYROT (E.). — Dosaggio colorimetrico del fluoro. (*Ann. Chim. Applicata* 1934, **24**, 74-78.)
78. PICCARD (J.) et BUFFAT (Ch.). — Détermination quantitative du fluor dans les composés organiques. (*Helv. Chim. Acta*, 1923, **6**, 1047.)
79. REED (O.-C.) and HUFFMAN (C.-F.). — Dairy cattle need phosphorus in ration. (*Michigan Agric. Expt. Stat., quarterly Bull.*, 1928, **10**, 151-156.)
80. REINBOLD (B. von.). — Beitrage zur Kenntnis des Methämoglobins. (*Zeit. für physiol. Chemie*, 1913, **85**, 250-285.)
81. SAHLBOM (N.) und HINRICHSSEN (F.-W.). — Notiz über die Titration der Kieselfluorwasserstoffsäure. (*Ber. Chem. Ges.*, 1906, **39**, 2609-2611.)
82. SCHRENK (W.-T.) and ODE (W.-H.). — determination of silica in the presence of Fluorspar. (*Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 1929, **1**, 201-202.)
83. SCHUCHT (L.) und MÖLLER (W.). — Zur Analyse der Kieselfluorwasserstoffsäure (*Ber. Chem. Ges.*, 1906, **39**, 3693-3696.)
84. SCHWALBE (C.-G.) und JUST (G.). — Zur Kenntnis der Fluornatrium-Bestimmung nach PENFIELD. (*Z. Analyt. Chem.*, 1933, **94**, 86-89.)

85. SÉVERIN (S.-E.). — Die Elektrodialyse als Methode der Trennung und Bestimmung von Basen in biologischen Flüssigkeiten.
- I. — Elektrodialyse wässriger Lösungen von Carnosin, Kreatin und Kreatinin. (*Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1934, **230**, 109-114.)
- MESCHKOWA (N.-P.) und SEVERIN (S.-E.)
- II. — Bestimmung des Gesamtbasengehaltes in Blut, Serum und Erythrocyten. (*Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1934, **230**, 114-121.)
86. SMITH (M.-C.), LANTZ (E.-M.) and SMITH (H.-V.). — The cause of mottled enamel. (*Science*, 1931, **74**, 244.)
87. SOMMELET (M.). — Sur un cas d'intoxication mortelle provoquée par le fluosilicate de sodium. (*Bull. Sc. Pharmacol.*, 1923, **30**, 211-216.)
88. STEIGER (G.). — The estimation of small amounts of fluorine. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1908, **30**, 219-225.)
89. SZEGOE (L.) et CASSONI (B.). — Sulla determinazione colorimetrica di tracce di fluoro. (*Giorn. di Chim. Ind. ed Applicata*, 1933, **15**, 599-602.)
90. TAMMANN (G.). — Ueber das Vorkommen des Fluors in organismen. (*Hoppe-Seyler, Zeitsch. f. physiol. Chem.*, 1888, **12**, 322-326.)
91. THOMAS (A.-W.) and MURRAY (H.-A.). — A physico-chemical study of gum arabic. (*Journ. of. Phys. Chem.*, 1928, **32**, 676-697.)
92. THOMPSON (T.-G.) and TAYLOR (H.-J.). — Determination and occurrence of Fluorides in sea water. (*Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 1933, **5**, 87-89.)
93. TOLLE (Ch.) and MAYNARD (L.-A.). — [*Record of Proc. of animal, Meeting of the Soc. of Animal production*, 1929.)
94. TREADWELL (W.-D.). — *Chim. Anal.* (Traduction Duringer et Goscinnny, Paris, Dunod et Pinat, 1912, **2**, 548-549.)

95. TREADWELL (W.-D.) und KOHL (A.). — Über die elektrometrische Titration des Fluorions. (*Helv. Chim. Acta.*, 1925, **8**, 500-507.)
- TREADWELL (W.-D.) und KOHL (A.). — Ein Beitrag zur analytischen Bestimmung des Fluorions. (*Helv. Chim. Acta.*, 1925, **9**, 470-485.)
96. TRIBOT (J.) et CHRÉTIEN (H.). — Sur un hydrate colloïdal de fer obtenu par électrodialyse et sur quelques-unes de ses propriétés. (*C. R. Ac. Sc.*, 1905, **140**, 144-146.)
97. VELU (H.). — Fluorure de calcium et cachexie fluorique expérimentale chez le rat blanc. (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, 377.)
98. VELU (H.). — Troubles dus aux phosphates naturels et cachexie fluorique due au fluorure de calcium. (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, 635.)
99. VELU (H.). — Dystrophie dentaire des mammifères des zones phosphatées (Darmous) et fluorose chronique. (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, 750.)
100. VELU (H.). — Possibilité de l'intoxication fluorique pendant la vie fœtale. (*Bull. Ac. Méd.*, 1933, **110**, 799-800.)
101. VILLE (J.) et DERRIEN (E.). — Modification du spectre de la méthémoglobine sous l'action du fluorure de sodium. (*C. R. Ac. Sc.*, 1905, **140**, 743.)
102. VILLE (J.) et DERRIEN (E.). — Sur la combinaison fluorée de la méthémoglobine. (*C. R. Ac. Sc.*, 1905, **140**, 1195.)
103. VILLE (J.) et DERRIEN (E.). — Sur la méthémoglobine et sa combinaison fluorée. (*C. R. Ac. Sc.*, 1905, **140**, 1549.)
104. VILLE (J.) et DERRIEN (E.). — Nouveau procédé de recherche du fluor dans les substances alimentaires. (*Bull. Soc. Chim.*, 1906, **35**, 239-246.)
105. VISINTIN (B.). — Studio sulla determinazione di piccole quantità di acido fluoridrico. (*Ann. Chim. Applicata*, 1934, **24**, n° 6, 315-326.)
106. WAGNER (C.-R.) and ROSS (W.-H.). — A modified method for the determination of fluorine with special application to the analysis of phosphates. (*Ind. Eng. Chem.*, 1917, **9** 1116-1123.)

107. WILLARD (H.-H.) and WINTER (O.-B.). — Volumetric method for determination of fluorine. (*Ind. Eng. Chem.*, 1933, **5**, 7-10.)
 108. WOEHLER (F.). — Analyse des Pyrochlors (*Pogg. Ann.*, 1839, **48**, 87-95.)
 109. WOODMANN (A.-G.) and TALBOT (H.-P.). — The etching test for small amounts of fluorides. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1906, **28**, 1437-1443.)
 110. WOODMANN (A.-G.) and TALBOT (H.-P.). — The fluorine content of malt liquors. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1907, **29**, 1362-1366.)
 111. ZDAREK (E.). — Über die Verteilung des Fluors in den einzelnen Organen des Menschen. (*Hoppe-Seyler, Zeitsch. f. physiol. Chem.*, 1910, **69**, 127-137.)
-

TABLE DES MATIÈRES

	PAGES
<i>Introduction</i>	9
CHAPITRE I. — <i>Le fluor normal dans les tissus animaux...</i>	15
CHAPITRE II. — <i>Action toxique du fluor et de ses dérivés.</i>	
<i>Importance de la Toxicologie du fluor</i> ...	21
CHAPITRE III. — <i>Méthodes de dosage du fluor</i>	33
I. Etude de quelques micro-méthodes	35
A. Dosage par précipitation et pesée	35
B. Dosage après volatilisation à l'état de fluo- rure de silicium	36
<i>a.</i> Dosage pondéral	36
<i>b.</i> Dosage volumétrique	37
C. Dosage après volatilisation à l'état d'acide hydrofluoborique	40
D. Dosage par gravure	41
E. Dosage après volatilisation à l'état d'acide hydrofluosilicique	42
F. Dosages colorimétriques	44

	PAGES
G. Dosage basé sur une propriété physique	46
a. Caractéristique spectroscopique	46
b. Conductibilité électrique	47
c. Potentiométrie	47
II. — Recherche d'une méthode applicable à la toxicologie	48
A. Méthode spectrophotométrique	48
1° Action du chlorure de sodium	59
2° Action du carbonate de sodium	60
3° Action du phosphate disodique	60
4° Action du pH	61
B. Méthodes colorimétriques	62
1° Méthode de W.-D. Armstrong	62
2° Méthode utilisant la réaction colorée de J.-H. DE BOER	65
CHAPITRE IV. — <i>Modes d'élimination de la matière organique</i>	71
I. — Destruction	74
A. Destruction en milieu alcalin	74
B. Destruction en milieu acide	75
II. — Ultrafiltration	77
A. Appareil et méthode utilisés	78
B. Essais	82
III. — Electrodialyse	86
A. Appareil et méthode employés	87
B. Essais	88
1° Variation de la durée de passage du courant	89
2° Variation du pH du milieu	91

	PAGES
3° Variation du milieu par l'adjonction de sels étrangers	92
a. Adjonction de sulfate de sodium	92
b. Adjonction de chlorure de sodium	95
1 Etude de la répartition du chlore au cours de l'électrodialyse	95
2 Dosage simultané du chlore et du fluor	96
4° Electrodialyse du fluor dans un milieu biologique	98
C. Elimination du chlore	102
1° Essai des charbons actifs	103
2° Essai du noir Norit	103
3° Essai du silicagel	103
4° Essai d'élimination par le vide	103
CHAPITRE V. — <i>Méthode utilisée</i>	105
I. — Electrodialyse	108
II. — Distillation par le procédé de H. H. WILLARD et O.-B. WINTER	112
a. Appareil employé	112
b. Mode opératoire	114
III. — Elimination du chlore	116
IV. — Dosage colorimétrique selon la réaction de J.-H. DE BOER	118
CHAPITRE VI. — <i>Toxicologie expérimentale</i>	121
Choix de l'animal d'expérience	121
Choix de la voie d'introduction du toxique	125
Choix de la forme d'administration du toxique ..	125
I. — Intoxications aiguës	127
Administration par voie sous-cutanée (Lapin C) ..	128
Administration par voie intra-veineuse (Chien R).	131
Administration par voie intra-veineuse (Lapin II) .	133

	PAGES
II. — Intoxications chroniques	137
Intoxication à doses très faibles (Lapin B)	139
Intoxication à doses faibles (Lapin A)	140
Intoxication semi-chronique (Lapin D)	144
Intoxication semi-chronique (Lapin E)	146
Fluorose expérimentale (Lapin F)	148
III. — Interprétation des résultats	149
<i>Conclusions</i>	151
<i>Bibliographie</i>	157

TABLE DES GRAVURES

	PAGES
Fig. 1. — Courbes d'absorption de la méthémoglobine et de la méthémoglobine fluorée	50
Fig. 2. — Variation de la courbe d'absorption de la méthémoglobine fluorée avec le taux de fluor	56
Fig. 3. — Appareil à ultrafiltration	79
Fig. 4. — Appareil à électrodialyser	109
Fig. 5. — Appareil à distiller	113

Imp. HENRY, 30, rue Pascal, Paris (5^e).
